

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathologische Biochemie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dipl. Chem. Luley)  
- Bereich Pathologische Biochemie -  
(Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gardemann)  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Rolle von endogenem Cardiolipin bei der Schädigung von isolierten  
Herzmitochondrien durch Hypoxie, Reoxygenierung und Calciumionen

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von      Andreas Storch

aus                      Magdeburg

Magdeburg, 2006

## **Dokumentationsblatt**

Storch, Andreas :

### **Rolle von endogenem Cardiolipin bei der Schädigung von isolierten Herzmitochondrien durch Hypoxie, Reoxygenierung und Calciumionen**

Dissertation, 56 Seiten; 11 Abbildungen; 2 Tabellen; 1 Gleichung; 54 Literaturquellen

Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 2006

Das Ziel dieser Arbeit war es, den funktionellen Einfluss von Cardiolipin auf isolierte Herzmitochondrien zu untersuchen, die durch 10 min Hypoxie, 5 min Reoxygenierung und exogenes  $\text{Ca}^{2+}$  in verschiedenen Konzentrationen gestresst wurden. Nach dieser Behandlung wurde für jede  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Atmungsaktivität der Mitochondrien bestimmt sowie deren Cardiolipingehalt ermittelt. Zur Bestimmung des Cardiolipingehalts wurde eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer durchgeführt, das isolierte Cardiolipin mit dem Fluoreszenzfarbstoff Naphthylessigsäureanhydrid markiert und sein Gehalt mittels der HPLC bestimmt.

Mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sank der Cardiolipingehalt der Mitochondrien. Hingegen stieg die Atmungsaktivität bei einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 0 bis 0,9  $\mu\text{M}$  und sank bei einer weiteren Erhöhung bis 1,8  $\mu\text{M}$ .

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob das durch Hypoxie und Reoxygenierung verlorene Cardiolipin durch exogenes, kommerzielles Cardiolipin substituiert werden kann und ob dies die Atmungsaktivität positiv beeinflusst. Tatsächlich wurde eine Steigerung der Atmung durch Applikation von Cardiolipin erreicht, sodass sich Cardiolipin als ein wichtiger funktioneller Baustein der Atmungskette unter diesen Bedingungen herausstellte.

## **Schlüsselwörter**

Cardiolipin, Hypoxie, Reoxygenierung, myokardiale Ischämie, Calcium, Rattenherzmitochondrien

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Material	
2.2 Geräte	17
2.3 Methoden	18
2.3.1 Präparation funktionstüchtiger Rattenherzmitochondrien	19
2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes der Mitochondrienstamm- suspension	20
2.3.3 Inkubationsbedingungen	
2.3.3.1 Inkubationsmedium	
2.3.3.2 Einstellung extramitochondrialer $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen	
2.3.3.3 Hypoxie und Reoxygenierung	21
2.3.4 Ermittlung der Atmungsgeschwindigkeit	
2.3.5 Cardiolipinextraktion	22
2.3.5.1 Herstellung des internen Standards	
2.3.5.2 Probenaufbereitung	23
2.3.5.3 Verlustanalyse von Etappen der Cardiolipinextraktion mittels Phosphatbestimmung	26
2.3.6 Quantifizierung von Cardiolipin mittels HPLC und Fluores- zenzdetektion	27
2.3.7 Statistische Auswertung	28
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1 Ausbeute der Mitochondrienpräparation	
3.2 Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf die mitochondriale Atmung	
3.3 Einfluss von extramitochondrialen Calciumionen auf die mitochondriale Atmung	31
3.4 Einfluss von extramitochondrialen Calciumionen sowie Hypoxie und Reoxygenierung auf die mitochondriale Atmung	32

	4
3.5 Analyse der Cardiolipinausbeute durch die Phospholipidextraktion	33
3.6 Darstellung von Cardiolipin mittels HPLC	34
3.7 Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung sowie $\text{Ca}^{2+}$ auf den mitochondrialen Cardiolipingehalt	35
3.8 Einfluss von exogenem Cardiolipin und $\text{Ca}^{2+}$ auf die Schädigung der Atmung durch Hypoxie und Reoxygenierung	36
<b>4 Diskussion</b>	<b>39</b>
4.1 Einfluss von Hypoxie, Reoxygenierung und $\text{Ca}^{2+}$ auf die mitochondriale Atmung	
4.2 Bestimmung des mitochondrialen Cardiolipingehalts	40
4.3 Rolle des Cardiolipingehalts während Hypoxie und Reoxygenierung	41
4.4 Schlussfolgerungen	44
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>46</b>
<b>6 Literatur</b>	<b>48</b>
<b>Erklärung</b>	<b>54</b>
<b>Danksagung</b>	<b>55</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>56</b>

### **Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraazetat
GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstierkunde, Hannover
HPLC	engl.: high performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
ICD-10	engl.: International statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (Internationale Klassifikation der Krankheiten, hier: 10. Revision, Version 1.3)
NAD(P)H	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (-phosphat)
SEM	engl.: standard error of mean (Standardfehler des Mittelwerts)
Tris	2-Amino-2 (hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenverhältnis

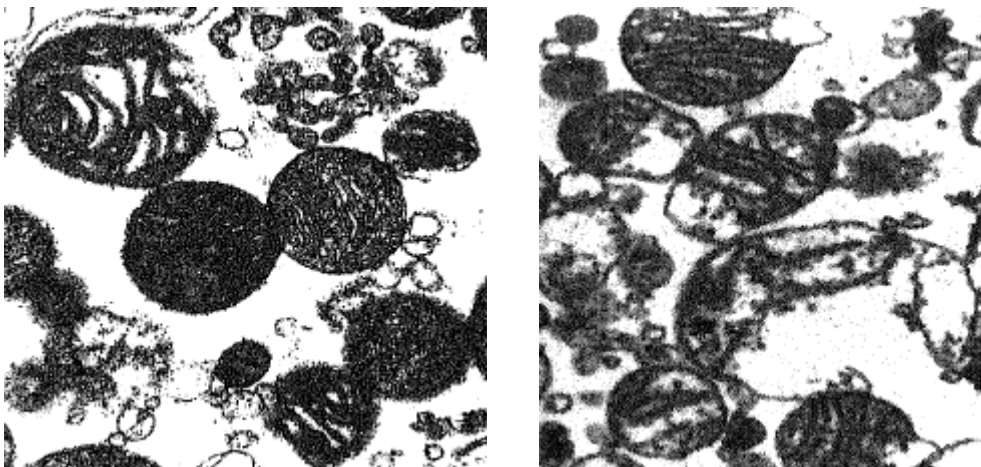
## **1 Einleitung**

Der akute Myokardinfarkt (definiert nach ICD-10) war im Jahre 2004 unabhängig vom Geschlecht die Todesursache Nummer zwei in Deutschland [51]. Daraus ergibt sich für die Forschung eine besondere Motivation, weiter an der Aufklärung der pathologischen Mechanismen dieser Erkrankung zu arbeiten, um eine noch bessere medizinische Versorgung der betroffenen Patienten zu erzielen. Der Stand der derzeitigen wissenschaftlichen Diskussion aus Themensicht lässt sich in der gebotenen Kürze wie folgt darstellen. An *In-Vivo*-Modellen des Herzinfarkts konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt (01.06.2006) folgende Pathomechanismen während der Ischämie ermittelt werden, die für die eigenen Untersuchungen relevant sind. Treten Durchblutungsstörungen der Koronararterien auf, sinkt die Konzentration des für die mitochondriale Atmung notwendigen Sauerstoffs im Herzmuskel ab. Die Atmungsgeschwindigkeit verlangsamt sich, und es wird weniger ATP durch oxidative Phosphorylierung gebildet. ATP wird jedoch als Energiequelle für den Erhalt der Ionengradienten zwischen Zellmilieu und der Umgebung benötigt. Zum Beispiel sorgt die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe unter ATP-Verbrauch für den Import von Kaliumionen in die Zelle und den Export von Natriumionen. Ohne diese Pumpe würden diese Ionen in die jeweilige Gegenrichtung diffundieren und zu einem Ausgleich der Ionenkonzentrationen zwischen Zelle und Umgebung führen. Damit wäre eine Muskelzelle für eine Kontraktion nicht mehr stimulierbar.

Unter natürlichen Bedingungen sorgen ATP-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Transporter für einen physiologischen Ca<sup>2+</sup>-Gradienten und schützen die Zelle vor einer schädigenden Ca<sup>2+</sup>-Überladung. Fallen diese Transporter aus, kommt es zum vermehrten Einstrom von Ionen in die Zelle, z.B. Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup>. Diesen Ionen folgt das Wasser, getrieben durch osmotische Kräfte. Die Zelle und ihre Organellen schwellen an. Zunächst zerreißen die dünneren Membranen der Organellen, z.B. der Peroxisomen, sodass sich deren proteolytische Enzyme, wie Phospholipasen und Proteasen, in das Zytoplasma ergießen. Diese Enzyme lösen die Bausteine weiterer Membranen auf und forcieren dadurch den Prozess der Destruktion. Als nächstes zerreißen die Mitochondrienmembranen, und Bestandteile aus Matrix und Intermembranraum gelangen ins Zytosol [49]. Schließlich wird auch die Zellmembran beschädigt und die Zelle platzt.

Nach einer 10-minütigen Ischämie im Herzmuskel kann elektronenmikroskopisch eine strukturelle Schädigung der Mitochondrien nachgewiesen werden, die durch eine Verdichtung der Matricelemente (Kondensation) gekennzeichnet ist [49]. Dauert die Ischämie länger an, kann eine Schwellung dieser Organellen mit einer Erweiterung ihres Intermembranspaltes beobachtet werden. In Abb. 1 sind im linken Abschnitt Rattenherzmitochondrien vor Ischämie, im rechten Abschnitt nach Ischämie dargestellt. Vor Ischämie sind die Mitochondrien annähernd kugelig und elektronendicht. Außerdem zeigen sie eine regelmäßige Struktur der Cristae, den Ausstülpungen der inneren Mitochondrienmembran.

Durch Ischämie kommt es zur Zerstörung von Mitochondrien (unten rechts) sowie zur Ausbildung von Vakuolen in den Organellen. Der in der Abbildung erkennbare massenweise auftretende Detritus weist zusätzlich auf zerstörte Mitochondrien hin. Charakteristisch für die mitochondriale Schädigung sind modifizierte Cristaestrukturen, die fragmentiert sind und desorganisiert wirken.

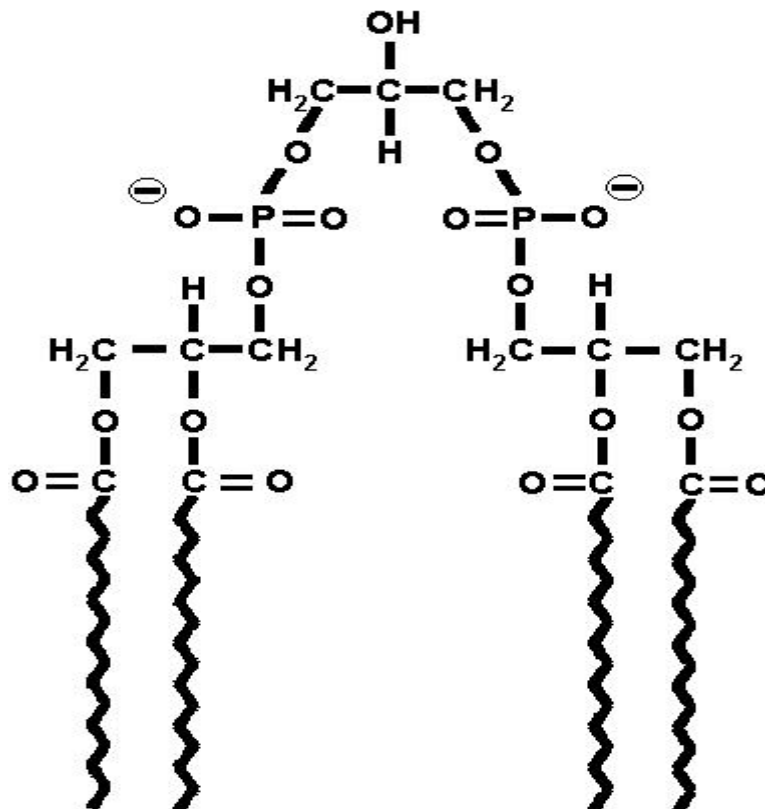


**Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Rattenherzmitochondrien vor (links) und nach Ischämie (rechts).** Ausschnitte aus Schweiger et al. [49]

Die ungeschädigten Mitochondrien (links) haben eine kugelige Form, sind elektronendicht und weisen geordnete Cristae auf. Nach Ischämie (rechts) sind die Mitochondrien geschwollen, besitzen Vakuolen und sind umgeben von Detritus aus geplatzten Mitochondrien. Die Cristae sind ungeordnet und wirken zerbrochen.

Besonders in der Reperfusionsphase nimmt die Menge an reaktiven Sauerstoffradikalen in der Zelle und den Mitochondrien zu, weil die zellulären Mechanismen der Radikalelimination versagen. Die Hemmung von Radikaleliminierenden Enzymen, wie der Superoxiddismutase, sowie Verluste an NAD(P)H als Substrat für das antioxidativ wirkende Glutathion-System werden dafür verantwortlich gemacht [9].

Die Wirkung der Sauerstoffradikale und der proteolytischen Enzyme aus den Peroxisomen führen zu einer dramatischen Veränderung der Protein- und Lipidarchitektur der Zelle. Unter den Lipiden sind besonders die Phospholipide der Membranen wie Cardiolipin (Abb.2) betroffen, weil sie einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren (z.B. Linolsäure) besitzen, deren Doppelbindungen sich als Angriffspunkte für die zerstörerischen Radikale besonders gut eignen [46], wodurch z.B. Lipohydroperoxide entstehen, die ihrerseits erneut Peroxidationsvorgänge auslösen.



**Abb. 2: Struktur des Cardiolipins, modifiziert nach [30] .**

Cardiolipin ist ein Phospholipid, welches bei Menschen und Säugetieren nur in Mitochondrien vorkommt. Im Jahr 1942 wurde es erstmals von Pangborn im Herzmuskel entdeckt, wahrscheinlich weil dieser besonders viele Mitochondrien enthält [32]. Dies spiegelt sich auch in seinem Namen „Cardiolipin“ (Herzfett) wider. Es wird vermutet, dass Cardiolipin als Baustein der inneren Mitochondrienmembran eine bedeutende Rolle besitzt, da es mit zahlreichen funktionell-bedeutsamen Proteinkomplexen des Mitochondriums assoziiert ist [17, 46]. Zum Beispiel geht es mit Komplex III der Atmungskette Bindungen ein, bestimmt dadurch dessen Aktivität und beeinflusst damit die gesamte Zellatmung [37].



Weiterhin sind Einflüsse auf mitochondriale Gene und deren Expression wahrscheinlich, da Cardiolipin die DNA-Polymerase, die Topoisomerase I und Histone modifiziert [46]. Auch beim Austausch von Metaboliten der Zelle wurden Einflüsse von Cardiolipin nachgewiesen: Es wurde gezeigt, dass Cardiolipin mit den Transportproteinen für ADP, ATP, Carnitin, Pyruvat und Phosphat assoziiert ist [17]. Darüber hinaus wird angenommen, dass es seine Synthese über einen Feedback-Mechanismus regeln kann, da es mit der Cardiolipin-Synthase verbunden ist [45]. In dieser Studie steigerte Cardiolipin bei eigenem Mangel die Aktivität von Cardiolipin-Synthase und inhibierte das Enzym bei Vorliegen in größerer Menge. Der Einfluss von Cardiolipin auf die o.g. Proteine ist von besonderer Relevanz, da Cardiolipin von allen Phospholipiden die höchste Bindungsaffinität besitzt. Selbst die ungeladenen Cardiolipinderivate haben diesen kompetitiven Vorteil.

Funktionelle Auswirkungen eines Cardiolipin-Defizits wurden in speziell-gezüchteten Hefemutanten untersucht [19]. So wurde neben verminderten Aktivitäten diverser mitochondrialer Enzyme wie ATPase und Cytochromoxidase ebenso Verminderungen beim Proteinimport, bei der Atmungsaktivität und beim mitochondrialen Membranpotenzial gefunden. Diese Befunde weisen darauf hin, dass Cardiolipin für die mitochondriale Bioenergetik benötigt wird. Außerdem ist Cardiolipin ein stabilisierender Membranbaustein, denn die Mutanten zeigten im Gegensatz zu normalen Populationen schon kurz über dem Temperaturoptimum von 30 °C einen Verlust von mitochondrialer DNA und die Unfähigkeit, Kolonien zu bilden. Es wird angenommen, dass Cardiolipin die Membranproteine vor Proteasen schützt, indem es ihre  $\alpha$ -Helix-Region stabilisiert [14].

Zusätzlich konnte eine Beteiligung von Cardiolipin an Intermembran-Kontaktstellen in Mitochondrien der Leber von Mäusen und in Hefekulturen nachgewiesen werden [2]. Einen weiteren Hinweis auf eine strukturelle Bedeutung von Cardiolipin lieferte die Beobachtung, dass eine selektive enzymatische Verdauung des Cardiolipins zu einer Zerstörung der Struktur des Mitochondriums führt [3].

Cardiolipin beeinflusst die Atmungsaktivität von Mitochondrien, weil ein Cardiolipinmangel vermutlich die Ausbildung des Protonengradienten der Atmungskette hemmt. Ohne diesen ist keine oxidative Phosphorylierung zur mitochondrialen ATP-Bereitstellung mehr möglich, welche auf Reoxidationen von Protonen-übertragenden Coenzymen wie NAD(P)H basiert und vermittelt zunächst

die Errichtung einer elektrochemischen Potenzialdifferenz über der inneren Mitochondrienmembran.

Die ATP-Synthase ist in der Lage, das Bestreben der Protonen nach Ausgleich dieser Differenz auszunutzen, um die bei diesem Ausgleich freiwerdende Energie in Form von ATP in eine gebrauchsfertige Form zu bringen.

Es gibt mehrere Hypothesen dafür, wie ein Cardiolipinmangel die Ausbildung des Protonengradienten hemmen kann:

1. Cardiolipin ist in die intramembranale  $H^+$ -Übertragung involviert [21]. Bei einem Mangel könnte es zur Entkopplung zwischen Atmungskette und ATP-Synthase kommen.
2. Der Mangel an Cardiolipin als Membranbaustein könnte eine direkte Verminderung der Membranbarriere bedeuten [50].
3. Cardiolipin aktiviert wichtige Membran-Transportproteine wie z.B. den ADP-ATP-Transporter [20]. Bei Cardiolipinmangel fehlt deshalb ADP im mitochondrialen Stoffwechsel.

Während einer Ischämie und nachfolgender Reperfusion bilden sich im Herzmuskel freie Radikale, besonders in den Mitochondrien [26]. Diese wurden für die Senkung des Cardiolipingehalts verantwortlich gemacht. Sie sollen das Cardiolipin entweder durch Oxidation so modifizieren, dass es nicht mehr als Bindungspartner für weitere Proteine fungieren kann [52], oder als Molekül zerstören [31]. Cardiolipin ist auf Grund seiner Struktur besonders anfällig gegenüber der oxidierenden Wirkung von Sauerstoffradikalen. Es ist trotz dieser Vulnerabilität in besonderem Maße solchen freien Radikalen ausgesetzt, da es direkt an den wichtigsten Produktionsorten von Sauerstoffradikalen im Mitochondrium lokalisiert ist. Dies trifft für den Enzymkomplex III der Atmungskette zu [37].

Die höchsten Verluste an Cardiolipin treten während der Reperfusionsphase auf [11, 22, 37], weil dabei weiterer Sauerstoff als potenzielles Substrat für die Radikalbildung in die geschädigte Zelle einströmt [37].

Einen indirekten Beweis dafür, dass der Cardiolipingehalt durch freie Radikale gesenkt wird, lieferte die Inhibierung des wichtigsten Produzenten dieser reaktiven Verbindungen, Komplex III [9]. Dies wurde durch Rotenon erreicht, einem Inhibitor für Komplex I [23]. Damit wurde der Elektronenfluss zu Komplex III abgeblockt. Dadurch konnte der Cardiolipinverlust bei Ischämie erheblich reduziert werden.

Einen weiteren Beweis erbrachten *In-vivo*-Studien am Rattenskelettmuskel. Der Verlust von Cardiolipin während der Reperfusion konnte hier durch die Zugabe von hochdosierter Ascorbinsäure (Vitamin C), welche als Antioxidans wirkt, reduziert werden [22].

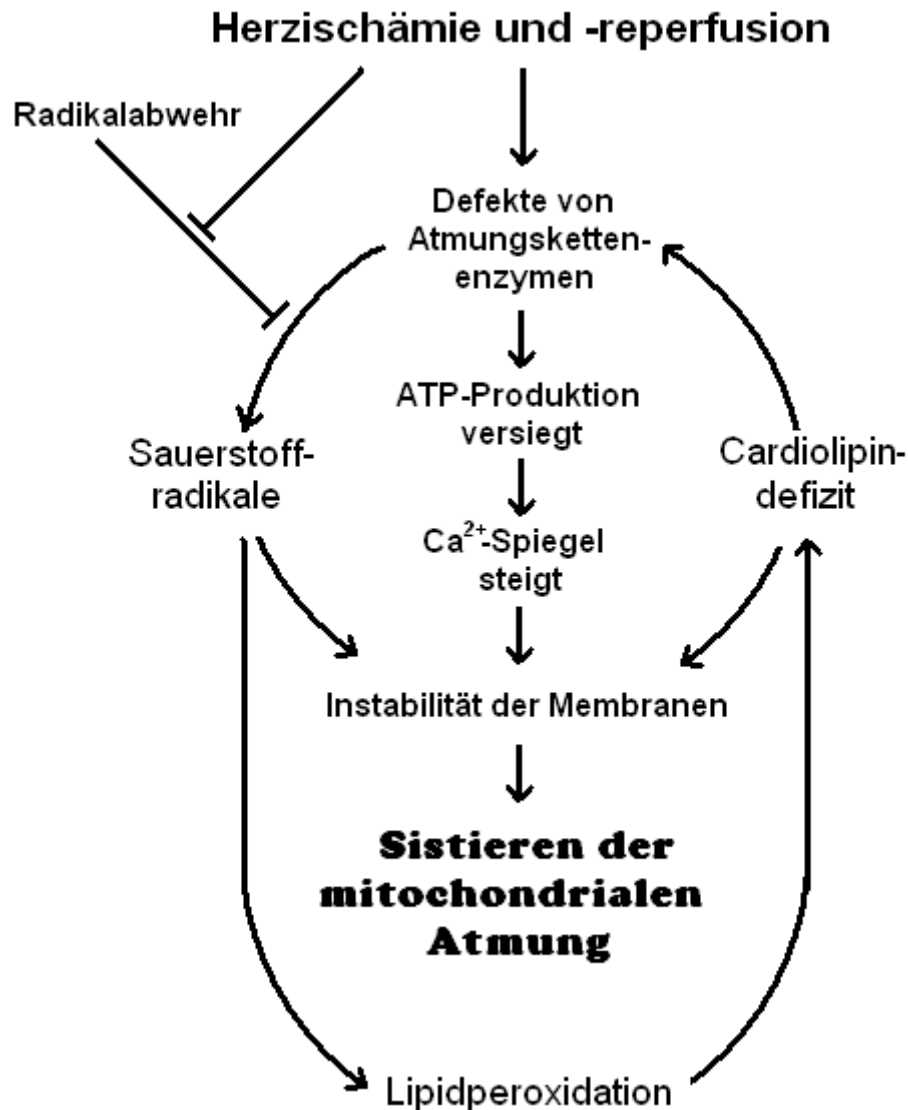
Die Cardiolipinverluste unter Ischämie und Reperfusion bewirken einen Funktionsausfall von mehreren Enzymkomplexen der Atmungskette. Der Aktivitätsverlust von Komplex III der Atmungskette unter Ischämie und Reperfusion korrelierte *in situ* in einem Partikelassay von Rattenherzmitochondrien mit dem Verlust von Cardiolipin [37]. Dabei gingen während der Ischämie 28 % des Cardiolipins verloren. Nach erfolgter Reperfusion war der Cardiolipingehalt schließlich halbiert. Die anderen untersuchten Phospholipide der Innenmembran wie Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin verringern sich ebenfalls, aber nicht in dem Ausmaß wie Cardiolipin. In dieser Studie konnte durch die exogene Zugabe von Cardiolipin die Aktivität von Komplex III vollständig wiederhergestellt werden, während dies weder mit den anderen Phospholipiden, noch mit peroxidiertem Cardiolipin gelang.

Ähnliche Ergebnisse brachten Studien an Rattenherzmitochondrien zur Abhängigkeit der Aktivität von Komplex I vom Cardiolipingehalt aus dem gleichen Institut. Unter Ischämie und Reperfusion halbierten sich die Aktivität von Komplex I, die State-3-Atmung und der Cardiolipingehalt. Die Zugabe exogenen Cardiolipins führte zur deutlichen Besserung der Aktivität von Komplex I, während dies weder mit den anderen o.g. Phospholipiden, noch mit peroxidiertem Cardiolipin gelang [35].

Zuvor wurden schon *In-vitro*-Studien an submitochondrialen Partikeln des Rinderherzes durchgeführt. Um die Bedingungen der Ischämie zu simulieren, wurden hier durch Xanthinoxidase freie Radikale erzeugt, die hier sowohl die Aktivität des Enzyms senkten wie auch den Cardiolipingehalt [33].

Ein weiterhin gut untersuchtes Atmungskettenenzym, welches Cardiolipin für seine volle Funktion benötigt, ist die Cytochromoxidase. Dieses Enzym besteht aus 13 Peptid-Untereinheiten, welche wiederum katalytische Untereinheiten benötigen. Zu den strukturellen katalytischen Untereinheiten zählt auch eine cardiolipinreiche Umgebung [39]. Der Verlust der Aktivität dieses Enzyms unter Ischämie *in situ* konnte in isolierten Mitochondrien des Kaninchens ausschließlich auf den Verlust des Cardiolipins zurückgeführt werden [24, 25]. Eine weitere Beobachtung dieser Studie war, dass der Cardiolipinverlust nicht alle Mitochondrien betraf, sondern ausschließlich in den ungeschützter liegenden subsarcolemmalen Mitochondrien (SSM) festgestellt wurde, während in den interfibrillär gelegenen Mitochondrien (IFM) der Cardiolipingehalt unverändert blieb [24]. Andere Studien zeigten, dass ein Cardiolipinverlust darüber hinaus zur Freisetzung von Cytochrom c prädisponierte, welches zur Aktivierung der Apoptose im reperfundierten Myokard führte [7].

Im folgenden Schema sind die wesentlichen bekannten Pathomechanismen während einer Herzischämie und –reperfusion zusammengefasst, um die Zusammenhänge zwischen Herzischämie, Cardiolipingehalt und mitochondrialer Atmungsaktivität zu verdeutlichen. Dabei spielt auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine bedeutende Rolle (Abb. 3).



**Abb. 3: Schematische Darstellung wesentlicher pathophysiologischer Vorgänge bei Herzischämie und -reperfusion**, modifiziert nach Petrosillo et al. [37].

Vorübergehende Ischämie im Herzmuskel führt zur Verringerung des Gehalts an dem Phospholipid Cardiolipin. Dieser Verlust wird auf die Peroxidation durch freie Radikale, reaktive Sauerstoffspezies und Peroxide zurückgeführt, die während Ischämie und Reperfusion von den Atmungskettenenzymen vermehrt gebildet werden. Normalerweise würden die zelleigenen Reparaturmechanismen eingreifen, wie z.B. die Glutathion-Peroxidase, die Lipohydroperoxide und Wasserstoffperoxyd eliminiert und Scavenger wie Vitamin C, welche die Radikalmenge eingrenzen. Da die Effizienz des Abwehrsystems aber selbst durch die Ischämie geschädigt wird (in Abb. 3 durch das Hemmsymbol —| gekennzeichnet), kann der im Bild skizzierte „Teufelskreis“ ungehindert ablaufen, der in einer mitochondrialen Dysfunktion endet.

Durch den Ausfall von ATP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern steigt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel im Zytosol und im Mitochondrium an, welcher die Permeabilität der Mitochondrien pathologisch erhöht. Diese Permeabilisierung wird auch durch den sinkenden Cardiolipingehalt forciert, weil Cardiolipin selbst ein Baustein der Innenmembran darstellt.

In den bisher vorliegenden Studien wurde die Ischämie und Reperfusion zunächst an ganzen Herzen erzeugt, und erst danach erfolgte die Präparation der Mitochondrien zur Untersuchung der Auswirkungen. In den eigenen Experimenten wurden zuerst Herzmitochondrien isoliert und dann einer Hypoxie und Reoxygenierung ausgesetzt, um die Rolle von Cardiolipin im Pathomechanismus der ischämiebedingten Schädigung von Mitochondrien noch klarer unter Ausschaltung von Artefakten durch die Präparation der Herzmitochondrien aufzuspüren. Insbesondere ging es um folgende offene Fragen:

1. Welchen Einfluss hat die Kombination aus Hypoxie und Reoxygenierung auf die Atmung isolierter Herzmitochondrien?
2. Wie beeinflusst der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel den Cardiolipingehalt in isolierten Herzmitochondrien, die durch Hypoxie und Reoxygenierung in ihrer Atmungsaktivität geschädigt wurden?
3. Ist die funktionelle Schädigung von isolierten Herzmitochondrien, die durch Hypoxie, Reoxygenierung und  $\text{Ca}^{2+}$  bedingt ist, hauptsächlich durch Cardiolipin verursacht?

In dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Beantwortung dieser Fragen geleistet werden. Um den konkreten Einfluss von Hypoxie, Reoxygenierung und  $\text{Ca}^{2+}$  auf Herzmitochondrien studieren zu können, wurden isolierte Mitochondrien der Ratte einem Wechsel von Hypoxie und Reoxygenierung bei unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ausgesetzt. Solche Untersuchungen sind naturgemäß am Gesamtorganismus nicht möglich, weil sich bei Ischämie und Reperfusion weitere Faktoren wie  $\text{Mg}^{2+}$ , NO und Wachstumsfaktoren ändern.

Zur Darstellung des Cardiolipingehalts war die Etablierung einer entsprechenden HPLC-Analytik in Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Methoden notwendig. Sie beinhaltete die Extraktion und die anschließende Auftrennung und

Quantifizierung des Cardiolipins mittels HPLC mit hochsensitiver Fluoreszenzdetektion. Zur exakten Quantifizierung war darüber hinaus die Herstellung von „hydriertem“ Cardiolipin als interner Standard eine wesentliche Voraussetzung. Schließlich wurde geprüft, ob durch Zugabe von Cardiolipin zu Herzmitochondrien, die einem Wechsel von Hypoxie und Reoxygenierung in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  ausgesetzt wurden, eine Verbesserung der Effektivität der oxidativen Phosphorylierung erreicht werden kann.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

An chemischen Materialien wurden verwendet:

Acetonitril, Carl Roth GmbH, Deutschland  
Adenosindiphosphat, Sigma-Aldrich, Deutschland  
Ammoniummolybdat, Sigma-Aldrich, Deutschland  
Cardiolipin C1649, bovine heart, 1426,24 Sigma, Deutschland  
Chloroform, Merck KGaA, Deutschland  
Diethylether, Carl Roth GmbH, Deutschland  
Dinatriumhydrogenphosphat, Sigma-Aldrich, Deutschland  
EDTA, Sigma-Aldrich, Deutschland  
EGTA, Sigma-Aldrich, Deutschland  
Ethanol, Merck KGaA, Deutschland  
Glutamat, Sigma-Aldrich, Deutschland  
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck KGaA, Deutschland  
L-Ascorbinsäure, Sigma-Aldrich, Deutschland  
Malat, Sigma-Aldrich, Deutschland  
Methanol, Merck KGaA, Deutschland  
n-Hexan, Merck KGaA, Deutschland  
Naphthylessigsäureanhydrid, Merck KGaA, Deutschland  
Natriumsulfat, Merck KGaA, Deutschland  
Nitrosomethylharnstoff, Sigma-Aldrich, Deutschland  
Perchlorsäure, J.T. Baker B.V., Niederlande  
Percoll, Sigma-Aldrich, Deutschland  
Platin-IV-oxid, Sigma-Aldrich, Deutschland  
Protein-Assay, Bio-Rad Laboratories München, Deutschland  
Pyridin, wasserfreies, Merck KGaA, Deutschland  
Saccharose, Serva Entwicklungslabor Heidelberg, Deutschland  
Supelclean-LC-Si-SPE-Säulen, Supelco  
Tris-Puffer, Carl Roth GmbH, Deutschland

Alle Chemikalien hatten analytische Qualität.



Als biologisches Material zur Mitochondriengewinnung wurden Herzen aus 24 normal ernährten (Altromin Standard Diät), etwa 200 g schweren männlichen Wistar-Ratten des Stammes HsdCpd: WU (Harlan-Winkelmann Deutschland GmbH, Borcheln) verwendet.

## **2.2 Geräte**

Dounce-Homogenisator, Kimble Kontes Co.

Einkanalschreiber, Kipp & Zonen

HPLC-Anlage, Waters

mit 2475 Multi  $\lambda$  Fluoreszenzdetektor, 600 S Controller, 616 Pumpe und  
717plus Autosampler

Kühlzentrifuge mit Rotor SS34, Sorvall

Messzelle mit Clark-Elektrode, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Oxygraph (Sauerstoffkonzentrationsmesser) , Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg

Spektralphotometer „Cary 1E“, Varian GmbH, Stuttgart

## 2.3 Methoden

Die zahlreichen Schritte von der Gewinnung der Herzen bis zur Messung des Cardiolipingehalts sind in einer Übersicht in Tabelle 1 dargestellt (Tab.1). Die einzelnen Komponenten werden in den folgenden Unterkapiteln näher erläutert.

1.	Entnahme der Rattenherzen
2.	Zerkleinerung der Herzen (Homogenisierung)
3.	Zentrifugation Resultat: isolierte Mitochondrien in einer Suspension
4.	Simulation des natürlichen Zellmilieus durch Zugabe eines Inkubationsmediums
5.	Sicherstellung der Atmungsaktivität (spontane und ADP-stimulierte), sonst Verwerfung der Probe
6.	Bestimmung des Proteingehalts zur Abschätzung der gewonnenen Mitochondrienmenge
7.	Zugabe verschiedener $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 oder 1,8 $\mu\text{M}$ Endkonzentration)
8.	10 min Sauerstoffentzug (Hypoxie)
9.	5 min Reoxygenierung
10.	erneute Messung der Atmungsaktivität (spontane und ADP-stimulierte)
11.	Cardiolipinabtrennung (Extraktion)
12.	Fluoreszenzmarkierung des Cardiolipins
13.	HPLC-Analyse
14.	Bestimmung des Cardiolipingehalts

**Tab.1: Übersicht über die Herstellung und Behandlung der Mitochondriensuspension aus dem Rattenherz**

### 2.3.1 Präparation funktionstüchtiger Rattenherzmitochondrien

Die Präparation funktionstüchtiger Mitochondrien erfolgte in einem KCl-Medium in Anlehnung an Schaller et al. [41]. Das Verfahren wurde zur besseren Imitation des Zytosolmilieus geringfügig modifiziert.

Die Ratten wurden entsprechend den Empfehlungen von GV-Solas gehalten und vor dem Experiment durch Nackenschlag getötet und deren Halsschlagadern mittels einer Schere durchtrennt. Dann wurde der Thorax eröffnet und die noch schlagenden Herzen entnommen. Die Herzen wurden in einem Isolationsmedium (180 mM KCl, 10 mM EDTA als Calcium- und Eisen-Chelatbildner, pH 7,4) auf 4 °C gekühlt und gewaschen. Von Gefäßen und Bindegewebe befreit, wurden die Herzen anschließend mittels einer Schere auf einem Uhrglas so zerkleinert, dass der Gewebebrei durch eine Record-Spritze (5 ml) in das Isolationsmedium gepresst werden konnte.

Nach der maschinellen Homogenisation in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit Teflon-Pistill mit 5 Hüben unter 600 U/min wurde die entstandene Suspension auf 2 Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 3000 U/min in einer Sorvall-Zentrifuge mit dem Rotor „SS 34“ für 5 min zentrifugiert. Der Niederschlag enthielt hauptsächlich Zellkerne und Bindegewebe, sodass dieser verworfen wurde [27]. Der Überstand wurde zur weiteren Reinigung nochmals bei 11000 U/min über 10 min zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet, in dem sich die Mitochondrien befanden, wurde nun mit 6 ml Isolationsmedium resuspendiert und mit 0,7 ml Percoll versetzt, damit die erhaltene Fraktion aus Mitochondrien jetzt noch von endoplasmatischem Reticulum, Golgi-Apparat und Plasmamembranen gereinigt werden konnte. Diese Suspension wurde nach manueller Homogenisation (5 Hübe) in einem Glashomogenisator (7 ml) abermals mit 11000 U/min über 10 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 15 ml Isolationsmedium und manueller Homogenisation (5 Hübe) wurde die Zentrifugation des Niederschlags mit 11000 U/min über 10 min wiederholt.

Nunmehr lag die endgültige Mitochondrienstammsuspension vor. Die Mitochondrien erwiesen sich in jeder der Suspensionen als funktionstüchtig, wie anhand eines Atmungstestes festgestellt werden konnte (Abb. 5). Die Durchführung des Atmungstests wird im Abschnitt 2.3.4 beschrieben. Die Aufbewahrung der Stammsuspension erfolgte in einem dunklen verschlossenen Glas in Eis.

### **2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes der Mitochondrienstammsuspension**

Mittels der Methode von Bradford [8] wurde der Proteingehalt der Mitochondrienstammsuspension bestimmt. Dabei wurde ein Protein-Assay von Bio-Rad Laboratories (Microassay Procedure) genutzt und der Gehalt an Protein mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt. Als Standard kam Rinder-Serum-Albumin zum Einsatz. Der Proteingehalt ist ein Maß für die Ausbeute an Mitochondrien und diente als Bezugsgröße für mitochondriale Parameter.

### **2.3.3 Inkubationsbedingungen**

#### **2.3.3.1 Inkubationsmedium**

Damit die isolierten Mitochondrien nach ihrer Präparation weiterhin funktionieren können, musste eine dem Zytosol ähnliche Umgebung bereitgestellt werden. Diese Aufgabe erfüllte das Inkubationsmedium. Es setzte sich folgendermaßen zusammen: 10 mM Saccharose, 120 mM KCl, 20 mM Tris-Puffer, 15 mM NaCl, 5 mM Kaliumphosphat, 0,5 mM EGTA und 1 mM freie Magnesiumionen bei einem pH-Wert von 7,4.

#### **2.3.3.2 Einstellung extramitochondrialer $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen**

Um die Wirkungen von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Aktivität der Mitochondrien zu messen, wurde eine konstante Menge der Mitochondrienstammsuspension mit zunächst 7 verschiedenen Konzentrationen (0; 0,3; 0,6; ...; 1,8  $\mu\text{M}$ )  $\text{Ca}^{2+}$  in einem Ca-EGTA-Puffer versetzt. Dazu wurde eine Stammlösung hergestellt, die 200 mM  $\text{CaCl}_2$  und 200 mM EGTA enthielt und auf pH 7,4 eingestellt war. Die angegebenen Endkonzentrationen von freiem  $\text{Ca}^{2+}$  wurden durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen dieses Puffers zum Inkubationsmedium erreicht. Dabei wurde die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration anhand der bekannten Komplexierungskonstanten [12] mit Hilfe eines selbst entwickelten Computerprogramms berechnet. Nachdem sich in mehreren Wiederholungen dieser Messreihen die höchste Atmungsaktivität bei 0,9  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  herauskristallisierte (Abb. 6), wurden die weiteren Messreihen auf 3 Konzentrationen (0; 0,9 und 1,8  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) reduziert.

### **2.3.3.3 Hypoxie und Reoxygenierung**

In die gesäuberte Messzelle wurden 2 ml Inkubationsmedium eingebracht und anschließend Stickstoff insuffliert. Der Sauerstoffgehalt der Messzelle konnte so bis auf 2 % des Ausgangswertes gesenkt werden. Dann wurden 200 µl Herzmitochondrien-Suspension hinzugegeben und die Zelle sofort geschlossen.

Dieser Eingriff erhöhte den Sauerstoffgehalt nur bis maximal 15 % des Ausgangswertes. Die Mitochondrien wurden nun 10 min in Hypoxie belassen, wobei sie den eingebrachten Sauerstoff selbst wieder innerhalb einer Minute verstoffwechselten, sodass sie sich von allein in den Zustand der Anoxie begaben. Nach diesen 10 min wurde die Zelle geöffnet, mit 2 ml luftgesättigtem Inkubationsmedium versetzt, um eine Reoxygenierung zu erreichen. Nach 5 min Reoxygenierung wurden je 5 mM Glutamat und 5 mM Malat als Substrate sowie 200 µM ADP zugesetzt. Danach erfolgte die Ermittlung der Atmungsaktivität. Nach der Messung wurden 1 ml Proben entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert, bis sie dann der HPLC zugeführt wurden.

### **2.3.4 Ermittlung der Atmungsaktivität**

Die Atmungsgeschwindigkeit der Rattenherzmitochondrien wurde amperometrisch mit einer Clark-Elektrode bestimmt, die in einer geschlossenen, gerührten und auf 30 °C temperierten Messzelle integriert war. Die Änderung der Sauerstoffkonzentration pro Zeiteinheit stellte das Messsignal dar. Zur Kalibrierung der Elektrode wurde der Sauerstoffgehalt des luftgesättigten Inkubationsmedium auf 217 nmol/ml festgelegt, welcher in anderen Studien ermittelt wurde [38]. Ein Oxygraph diente zur Darstellung des Messsignals. Die Aufzeichnung fand mittels eines Einkanalschreibers statt. Die Eichung des Messsystems erfolgte bei einer Luftsauerstoffsättigung im Medium von 100 %. 200 µl der Mitochondriensuspension wurden in 2 ml Inkubationsmedium in die Zelle gegeben und mit 5 mM Glutamat und 5 mM Malat als Substrate versetzt. Danach wurde die Messzelle luftdicht abgeschlossen und die Aufzeichnung der Atmungsaktivität gestartet. Im nächsten Schritt wurden 200 µM ADP hinzugegeben. Nunmehr wurde die aktive Atmung aufgezeichnet.

### 2.3.5 Cardiolipinextraktion

#### 2.3.5.1 Herstellung des internen Standards

Bei der Extraktionsmethode handelte es sich um einen Komplex zahlreicher Handgriffe. Deshalb musste mit Verlusten am interessierenden Cardiolipin gerechnet werden. Weil für dieses Experiment aber gerade die verbleibende Menge des Cardiolipins unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden sollte, wurde ein interner Standard benötigt, welcher derselben Prozedur unterworfen wurde und somit identische Verluste aufwies. Als Standard wurde kommerzielles Cardiolipin (aus Rinderherzen, Firma Sigma, Deutschland) gewählt. Dieses würde sich jedoch in der reinen Form bei der HPLC genau über die Peaks des Rattenherzcardiolipins projizieren, da die Cardiolipine der beiden Spezies sehr ähnliche Retentionszeiten in der HPLC-Analyse besitzen. Deshalb wurde in diesem Fall eine chemische Reaktion benutzt, die Hydrierung, um das kommerzielle Cardiolipin bei der chromatographischen Trennung zeitlich später als Peaks anzeigen zu lassen und so als internen Standard identifizieren zu können. Durch die Beladung mit Wasserstoff wurde das kommerzielle Cardiolipin zu einer künstlich gesättigten Variante, dem Tetrastearoyl-Cardiolipin. Dieses wurde später eluiert als seine ungesättigte natürliche Form. Da Cardiolipin aber nur unter hoher Energiezufuhr Wasserstoff als Bindungspartner annimmt, wurde Platin-IV-oxid als Katalysator verwendet, um diesen Schritt zu vereinfachen.

Eine Menge von 25 mg Platin-IV-oxid wurde in 1 ml Methanol eingetragen und anschließend 5 min bei 40 °C mit Wasserstoff durchblasen. Im Anschluss wurde 2,5 mg in Methanol gelöstes kommerzielles Cardiolipin dem Katalysator zugegeben und weitere 30 min bei 40 °C mit Wasserstoff begast. Der Katalysator wurde durch Zentrifugation (12000 U/min für 3 min unter den im Kapitel 2.3 genannten Zentrifugationsbedingungen) und Filtration mittels Augenwatte entfernt. Die nun klare Lösung wurde unter Argon bei 30 °C eingeeengt und in 2 ml Ethanol-Chloroform (2:1 v/v) aufgenommen.

### 2.3.5.2 Probenaufarbeitung

Die einzelnen Schritte der Probenaufarbeitung sind in Tab. 2 zusammengestellt.

1.	Extraktion der Phospholipide nach Bligh und Dyer
2.	Anreicherung des Cardiolipins durch saure Extraktion
3.	Methylierung des Cardiolipins
4.	Festphasenextraktion
5.	Fluoreszenzmarkierung
6.	Festphasenextraktion

**Tab. 2.: Grundschrirte bei der Extraktion des Cardiolipins**

#### 2.3.5.2.1 Extraktion der Phospholipide aus Rattenherzenmitochondrien

Im ersten Schritt der Probenaufarbeitung wurden die Phospholipide nach der Methode von Bligh und Dyer [6] aus der Mitochondriensuspension mittels Phasentrennung extrahiert. Dazu wurden je 3,6 nmol des eingeeugten Cardiolipin-Standards in 4 ml Methanol und 2 ml Chloroform aufgenommen und je 1 ml Mitochondrienprobe hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde kräftig geschüttelt und anschließend für 20 min im Wasserbad bei 37 °C zur Proteinfällung inkubiert und danach bei Zimmertemperatur abgekühlt. Zur Phasentrennung wurden dann 0,01 M Salzsäure (2,8 ml) und 2 ml Chloroform zugefügt, das Ganze kräftig geschüttelt und für 10 min bei 3000 U/min in der Sorvall-Zentrifuge mit dem Rotor „SS 34“ zentrifugiert. Es bildeten sich 2 Phasen. Die untere Chloroformphase mit den Phospholipiden wurde abgenommen, während die verbleibende wässrige Oberphase zur Erhöhung der Ausbeute einer erneuten Phasentrennung mittels 2 ml Chloroform und 1 ml Methanol unterzogen und anschließend verworfen wurde. Alle vereinigten Chloroformphasen wurden schließlich bei 30 °C unter Argon eingeeugt.

#### **2.3.5.2.2 Anreicherung des Cardiolipins durch saure Extraktion**

Im zweiten Schritt der Probenaufarbeitung wurde das Phospholipidgemisch mittels Salzsäure angesäuert. Dazu wurden jedem Phospholipidextrakt unter fortlaufender Eiskühlung 2 ml Methanol, 1 ml Chloroform und 1 ml 0,1 M Salzsäure zugegeben. Das Gemisch wurde kräftig geschüttelt und für 5 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden 1 ml Chloroform und 1 ml 0,1 M Salzsäure zugefügt und ein weiteres Mal kräftig geschüttelt und für 1 min ins Eis gesetzt. Die entstandene untere Chloroformphase wurde vorsichtig mit der Pipette abgezogen und in neue Reagenzgläser überführt, während die verbleibende wässrige Oberphase einer erneuten Phasentrennung unterzogen und anschließend verworfen wurde. Alle vereinigten Chloroformphasen wurden schließlich bei 30 °C unter Argon eingeeengt.

#### **2.3.5.2.3 Methylierung des Cardiolipins**

Um Cardiolipin als Bestandteil des Phospholipidgemisches besser abtrennen zu können, mussten seine chemischen Eigenschaften modifiziert werden. Schlame et al. [48] wählten dafür die Methylierung der beiden Phosphatgruppen des sauren Cardiolipins mittels Diazomethan, um Cardiolipin in ein sehr apolares Phospholipid umzuwandeln. Die Methylierung erfolgte mit frisch hergestelltem Diazomethan: In einem Erlenmeyerkolben wurden unter fortlaufender Eiskühlung und Schwenken 0,05 mol Nitrosomethylharnstoff in kleinen Portionen in 50 ml Diethylether eingetragen, der mit 17 ml 40%iger Kalilauge unterschichtet wurde. Die gelbe ätherische Diazomethanlösung wurde abgenommen und auf festem Kaliumhydroxid bei –70 °C aufbewahrt. Der in 0,2 ml Chloroform gelösten Probe wurde 0,6 ml der Diazomethanlösung zugegeben, vorsichtig geschüttelt und das Gemisch für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Argon bei 20 °C verdampft.



#### **2.3.5.2.4 Erste Festphasenextraktion**

Diese Festphasenextraktion war ein Reinigungsschritt und diente zur Anreicherung des methylierten Cardiolipins. Die Proben wurden durch eine Festphasenextraktion über Supelclean-LC-Si-Säulen (100 mg Silicagel pro Säule) gereinigt.

Zunächst wurden die Säulen mit 5 ml Diethylether-Ethanol (9:1 v/v) äquilibriert. Nach dem Aufgeben der Proben, die in 0,2 ml Chloroform gelöst waren, wurden die Säulen mit 2 ml Diethylether-Ethanol (9:1 v/v) eluiert.

#### **2.3.5.2.5 Fluoreszenzmarkierung**

Hier wurde die freie OH-Gruppe des Cardiolipins mit Naphthylgruppen derivatisiert, welche charakteristische Absorptionsmaxima bei 272, 282 und 292 nm Wellenlänge zeigen, sodass eine klare Identifizierungsmöglichkeit durch die Fluoreszenzdetektion erreicht wurde. Das Eluat wurde unter Argon bei 30 °C getrocknet und danach in 25 µmol des Fluoreszenzfarbstoffes 1-Naphthylessigsäureanhydrid in 0,25 ml wasserfreiem Pyridin gelöst. Das Gemisch wurde für 2 Stunden bei 40 °C inkubiert. Daraufhin wurden jeweils 6 ml n-Hexan zugegeben und die Proben für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert, um unlösliches Material zu sedimentieren und eine Phasentrennung zu erreichen. Der Überstand wurde durch Zugabe von 1 ml Aqua destillata und 5 min Zentrifugation bei 2000 U/min einer weiteren Extraktion unterzogen. Die oberen Hexanphasen wurden durch dehydratisiertes Natriumsulfat vom restlichen Wasser befreit und schließlich unter Argon bei 30 °C eingengt.

#### **2.3.5.2.6 Zweite Festphasenextraktion**

Die Rückstände wurden in 1 ml n-Hexan-Diethylether (1:1 v/v) aufgenommen und einer zweiten Festphasenextraktion zugeführt, um eine weitere Anreicherung zu erreichen. Die Supelclean-Säulen wurden mit dem gleichen Gemisch äquilibriert. Danach wurden die Proben aufgegeben und mit 2 ml Diethylether-Ethanol (95:5 v/v) eluiert. Das Eluat wurde gesammelt, getrocknet, in 1 ml n-Hexan-Ethanol (1:1 v/v) gelöst und in Aliquoten der HPLC zugeführt.

### **2.3.5.3 Verlustanalyse von Etappen der Cardiolipinextraktion mittels Phosphatbestimmung**

Um zu analysieren, an welchen Passagen der Lipidextraktion besonders hohe Verluste von Cardiolipin zu befürchten sind, wurden während einer Extraktion kommerziellen Cardiolipins nach verschiedenen Etappen des Verfahrens Proben entnommen und deren Phosphatgehalt photometrisch nach der Methode von Rouser et al. [40] bestimmt. Da ein Molekül Cardiolipin 2 Phosphatgruppen enthält, siehe auch Strukturformel in Abb. 2 auf Seite 8, ist der gemessene Phosphatgehalt auf die verbliebene Cardiolipinmenge übertragbar. An folgenden Etappen wurden Proben zur Analyse entnommen:

1. nach saurer Extraktion des Cardiolipins
2. nach Methylierung des Cardiolipins
3. nach 1. Festphasenextraktion und Zugabe des Fluoreszenzindikators
4. nach Abschluss der Fluoreszenzmarkierung
5. nach 2. Festphasenextraktion

Die gewonnenen Proben wurden jeweils mit 70%iger Perchlorsäure (0,26 ml) versetzt und im Heizblock für 20 min bei 180 °C im mit Aluminiumfolie leicht abgedeckten Reagenzglas erhitzt, um Phosphat aus den Bindungen im Cardiolipin freizusetzen. Nach Abkühlung wurden je 0,92 ml Aqua destillata, 1,25%iges Ammoniummolybdat (0,4 ml) und 5%ige L-Ascorbinsäure (0,4 ml) zur Farbentwicklung zugegeben. Nach Erhitzen im siedenden Wasserbad für 5 min und anschließender Abkühlung wurden die Extinktionen der Proben im Photometer bei einer Wellenlänge von 797 nm gemessen. Als Phosphatstandard wurde 1 mM Dinatriumhydrogenphosphat verwendet.

### 2.3.6 Quantifizierung von Cardiolipin mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion

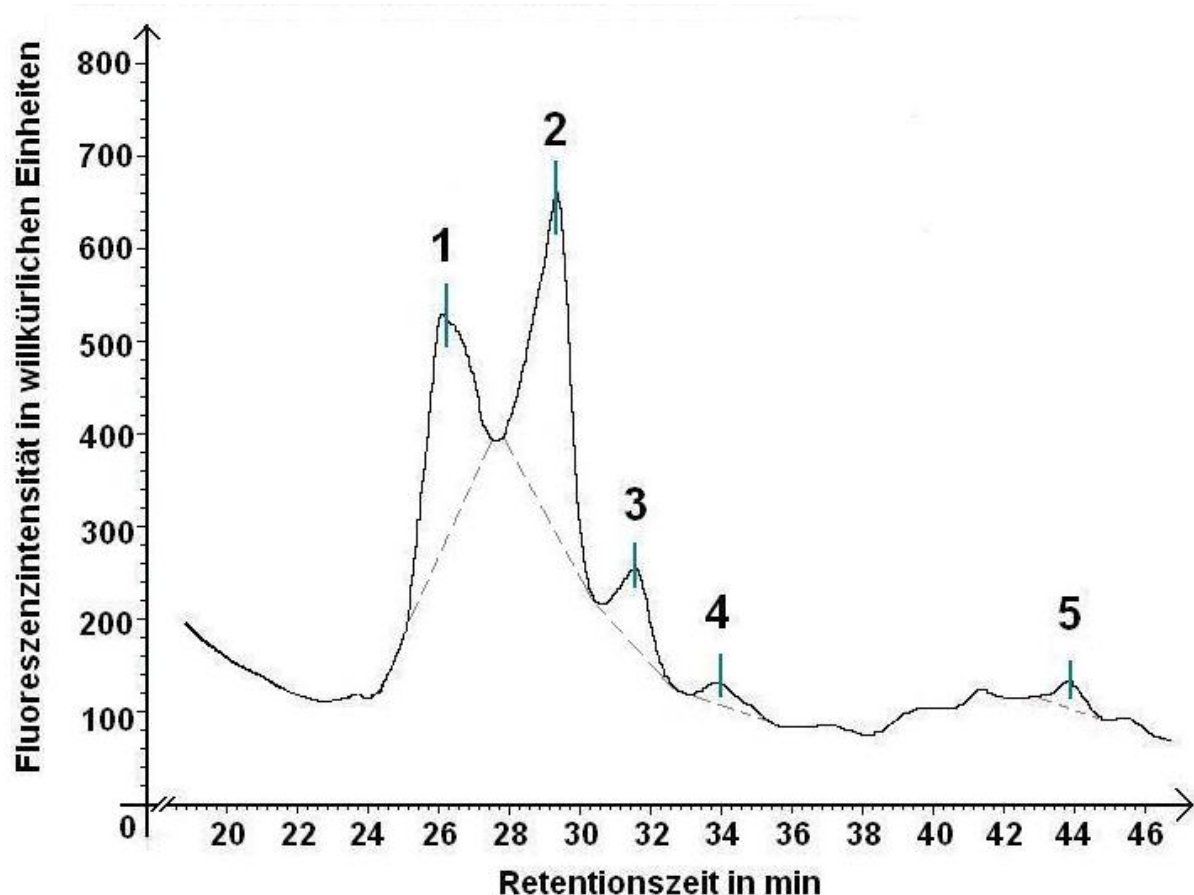
Es wurden jeweils 200 µl der Cardiolipinlösungen mittels HPLC aufgetrennt. Die Trennung erfolgte über eine Säule (LiChroCart Supersphere 250 x 4 mm, 4 µm) mit Vorsäule der Firma Merck und einem kontinuierlichen Lösungsmittelgradienten von Acetonitril/2-Propanol (8:2 v/v) bis zu Acetonitril/2-Propanol (3:7 v/v) innerhalb von 50 min. Die HPLC-Anlage war ein Waters-System, welches aus einem Lösungsmittelreservoir, einer Waters 616 Pumpe (gesamte Flussrate 1 ml/min), einem Waters 600 S Controller, einem Waters 717plus Autosampler und einem Waters 2475 Multi λ Fluoreszenzdetektor (Erregungswellenlänge 280 nm, Emissionswellenlänge 360 nm, Verstärkung = 1) bestand. Die Daten wurden gesammelt und verarbeitet durch einen PC mit einer Waters Millennium 32 Software Version 4.0. Im HPLC-Chromatogramm fanden sich die typischen 4 Peaks einer Cardiolipinanalyse sowie der interne Standard wieder (Abb. 4). Die 4 Peaks entsprechen 4 molekularen Cardiolipin-Spezies [48], die zeitlich in folgender Reihenfolge detektiert werden:

1. Trilinoleoyl-linolenoyl-Cardiolipin, 2. Tetralinoleoyl-Cardiolipin, 3. Trilinoleoyl-oleoyl-Cardiolipin und 4. Dilinoleoyl-dioleoyl-Cardiolipin. Die Berechnung der Cardiolipin-Konzentration des jeweiligen Probenansatzes erfolgte unter Berücksichtigung des mitgeführten internen Standards, indem das Verhältnis der Flächen unter den Peaks (Summe der Cardiolipin-Spezies aus der Probe / interner Standard) mit der Konzentration des internen Standards multipliziert wurde (Gleichung 1).

$$[\text{CL}]_P = \frac{\sum A_P}{A_S} \times C_S \quad (1)$$

$[\text{CL}]_P$  ist die Cardiolipin-Konzentration einer Probe,  $\sum A_P$  ist die Summe der Peakflächen der Cardiolipin-Spezies aus der Probe,  $A_S$  ist die Peakfläche des internen Standards,  $C_S$  ist die Konzentration des internen Standards.

Zur Berechnung der Flächen wurde die Basislinie von der Waters Millennium 32 Software ermittelt (gestrichelte Linie in Abb. 4). Wie in Abb. 4 zu sehen ist, befinden sich in der Retentionszeit von 36 bis 42 min noch einige kleine Peaks, die nicht integriert wurden. Diese stellen vermutlich Trümmer von zerstörtem Cardiolipin, anderen Phospholipiden und unbekannten Substanzen dar.



**Abb. 4: HPLC-Chromatogramm von unbehandelten (ohne Hypoxie und Reoxygenierung) Rattenherzmitochondrien.** Das HPLC-Chromatogramm zeigt das Fluoreszenzsignal der Cardiolipin-Spezies in Abhängigkeit von der Retentionszeit. Die markierten Peaks repräsentieren: Trilinoleoyl-linolenoyl-Cardiolipin (Peak 1), Tetralinoleoyl-Cardiolipin (Peak 2), Trilinoleoyl-oleoyl-Cardiolipin (Peak 3) und Dilinoleoyl-dioleoyl-Cardiolipin (Peak 4). Der interne Standard (Tetrastearoyl-Cardiolipin) findet sich in Peak 5. Die abgegrenzten Flächen unter den Peaks entsprechen der gefundenen Menge des jeweiligen Stoffes. Die gestrichelte Linie entspricht der von der Software errechneten Basislinie.

### 2.3.7 Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, sofern nicht anders ausgewiesen. Die ermittelten Flächeninhalte der HPLC-Chromatogramme des Cardiolipins wurden einer explorativen Datenanalyse mittels eines einseitigen t-Tests unterzogen (Abb. 9 auf Seite 35). Bei der Analyse des Cardiolipingehalts unter verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wurden Paarvergleiche entsprechend der Bonferroni-Methode erstellt [5]. Eine Differenz galt dann als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  war.

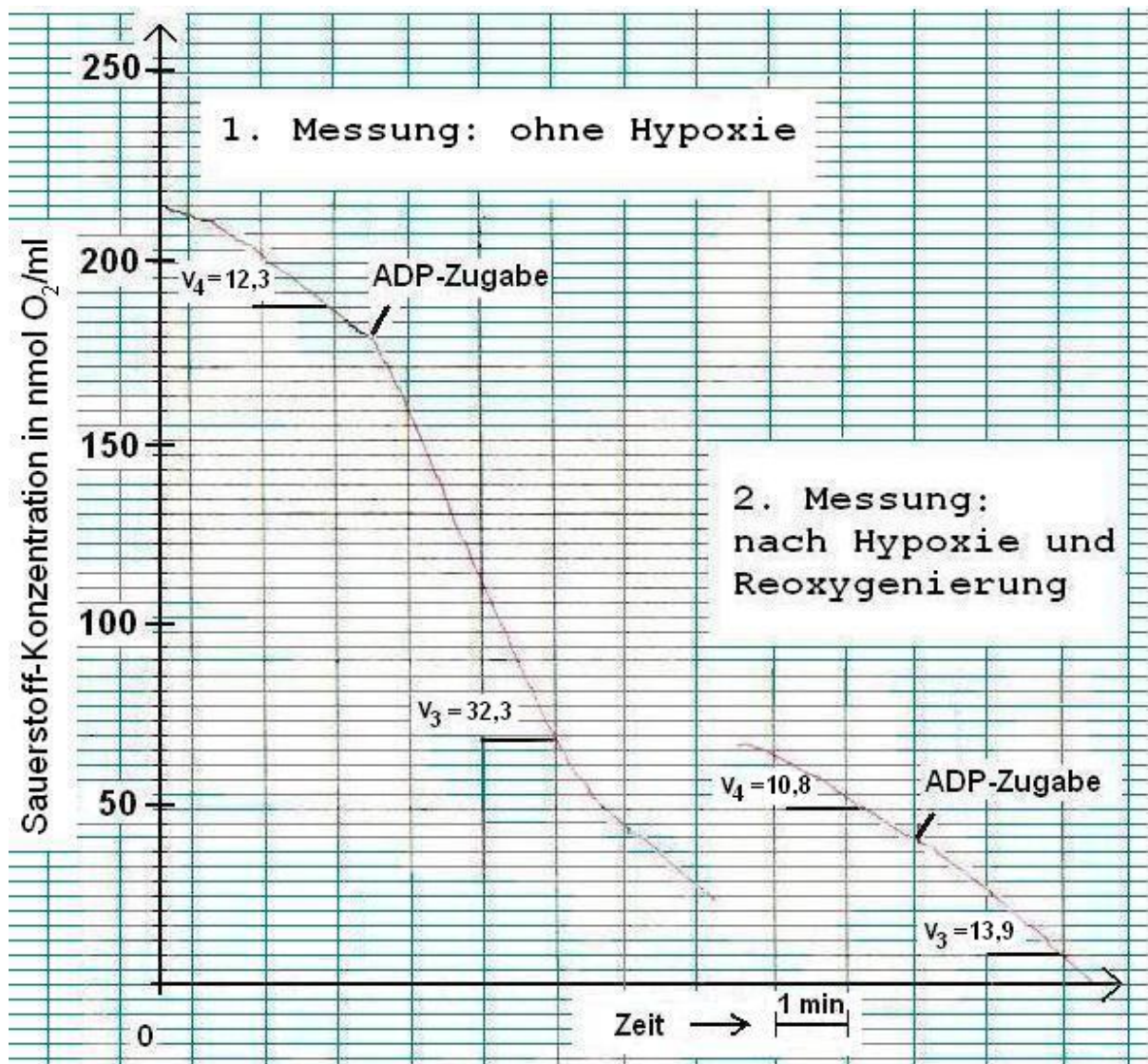
### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Ausbeute der Mitochondrienpräparation**

Um die Menge der gewonnenen Mitochondrien abzuschätzen, wurde für jede Präparation der Proteingehalt der Mitochondriensuspension bestimmt. Er wurde als Bezugsgröße verwendet, da er mit der Mitochondrienmenge korreliert. Im Mittel wurde ein Proteingehalt von  $26 \pm 6,8$  mg/ml pro Mitochondriensuspension erzielt ( $n = 7$ ). Der aktuelle Gehalt schwankte abhängig vom jeweiligen Lebendgewicht und der Größe des Herzens.

#### **3.2 Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf die mitochondriale Atmung**

Um den Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Funktion der Herzmitochondrien zu untersuchen, wurde das Atmungsverhalten analysiert. Dazu wurden Rattenherzmitochondrien (2,6 mg mitochondriales Protein pro ml Inkubationsmedium) bei 30 °C im Inkubationsmedium einem Wechsel von 10 min Hypoxie, gefolgt von 5 min Reoxygenierung, ausgesetzt. Als Kontrolle (Referenzzustand) wurde das Atmungsverhalten von Mitochondrien, die nicht einem Wechsel aus Hypoxie und Reoxygenierung ausgesetzt wurden, ermittelt. Sonst erfolgte die Messung nach erfolgter Hypoxie und Reoxygenierung (Abb. 5). Im ersten Teil jeder Messung wurde die Ruheatmung (State 4) registriert, in der die Mitochondrien in Gegenwart von 5 mM Glutamat und 5 mM Malat kein ATP produzieren. Durch Zugabe von 200  $\mu$ M ADP wurde die aktive Atmung (State 3) stimuliert. Bei beiden Atmungszuständen wurden die Geschwindigkeiten der Änderung der Sauerstoffkonzentrationen berechnet und in nmol O<sub>2</sub>/mg/min angegeben. Nach Hypoxie fiel die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs durch ADP-Zugabe deutlich geringer aus als in der Referenzmessung (Abb. 5). Dies dokumentiert eine deutliche Einschränkung der ATP-Produktion durch Hypoxie und Reoxygenierung, die Ausdruck der Schädigung des mitochondrialen Atmungsapparates ist. Beim Vergleich beider Bedingungen bei der State-3-Atmung zeigte sich, dass durch Hypoxie und Reoxygenierung die oxidative Phosphorylierung um 57 % gesenkt wurde.



**Abb. 5: Originalprotokoll des Atmungsverhaltens von Herzmitochondrien ohne sowie nach Hypoxie und Reoxygenierung .**

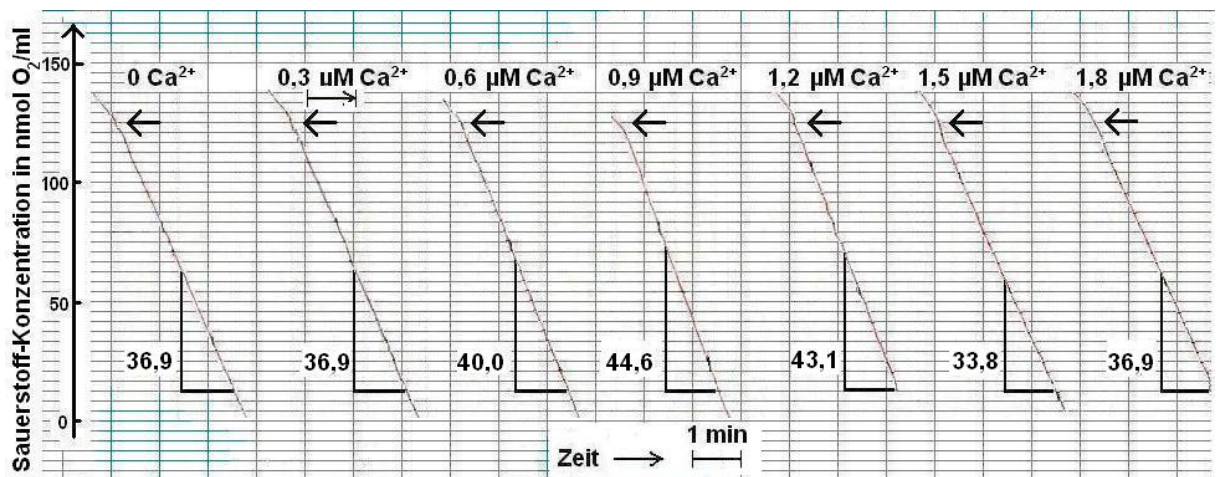
Rattenherzmitochondrien (2,6 mg/ml) wurden bei 30 °C im Inkubationsmedium einem Wechsel von 10 min Hypoxie und 5 min Reoxygenierung ausgesetzt. Dabei erfolgte jeweils ohne Hypoxie und nach der Reoxygenierung eine Aufzeichnung der Sauerstoff-Konzentration. In jeder Messung wurde zunächst unter 5 mM Glutamat und 5 mM Malat die Ruheatmung (State 4) gemessen und die Atmungsgeschwindigkeit ( $v_4$ ) in nmol O<sub>2</sub>/mg/min ermittelt. An den angegebenen Punkten wurde 200 µM ADP zugesetzt, um die aktive Atmung (State 3) zu stimulieren, deren Atmungsgeschwindigkeit ( $v_3$ ) ebenso ermittelt wurde. Die State-3-Atmung wurde durch Hypoxie und Reoxygenierung um 57 % gesenkt. Das dargestellte Originalprotokoll ist typisch für 8 Mitochondrienpräparationen.



### 3.3 Einfluss von extramitochondrialen Calciumionen auf die mitochondriale Atmung

Um den Einfluss des extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels auf die Atmung zu untersuchen, wurden die Mitochondrien in Gegenwart von einer von sieben verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (0; 0,3; 0,6; ...; 1,8  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) inkubiert und anschließend das Atmungsverhalten analysiert. In einem Bereich von 0,6 bis 1,2  $\mu\text{M}$  wirkte  $\text{Ca}^{2+}$  schützend auf die Atmung, weil die Atmungsgeschwindigkeit größer als 36,9 nmol  $\text{O}_2/\text{mg}/\text{min}$  war, welche in der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Inkubation erreicht wurde (Abb. 6). Am stärksten war dieser protektive Effekt bei einer Konzentration von 0,9  $\mu\text{M}$  (Abb. 6 und 7). Ein solcher schützender Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$  wurde bereits bei Lebermitochondrien von Ratten nachgewiesen [43]. Oberhalb von 1,2  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  verminderte sich dieser Effekt, und die Atmungsgeschwindigkeit näherte sich dem Wert der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Inkubation an.

Da sich dieses mitochondriale Atmungsverhalten in weiteren  $\text{Ca}^{2+}$ -Inkubationen wiederholte, wurde für die nachfolgenden Untersuchungen, in denen der Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung hinzutrat, der Umfang der Konzentrationen des  $\text{Ca}^{2+}$  auf die drei funktionell charakteristischen Konzentrationen (0; 0,9; 1,8  $\mu\text{M}$ ) begrenzt (Abb. 7 auf Seite 32 und Abb. 10 auf Seite 36).

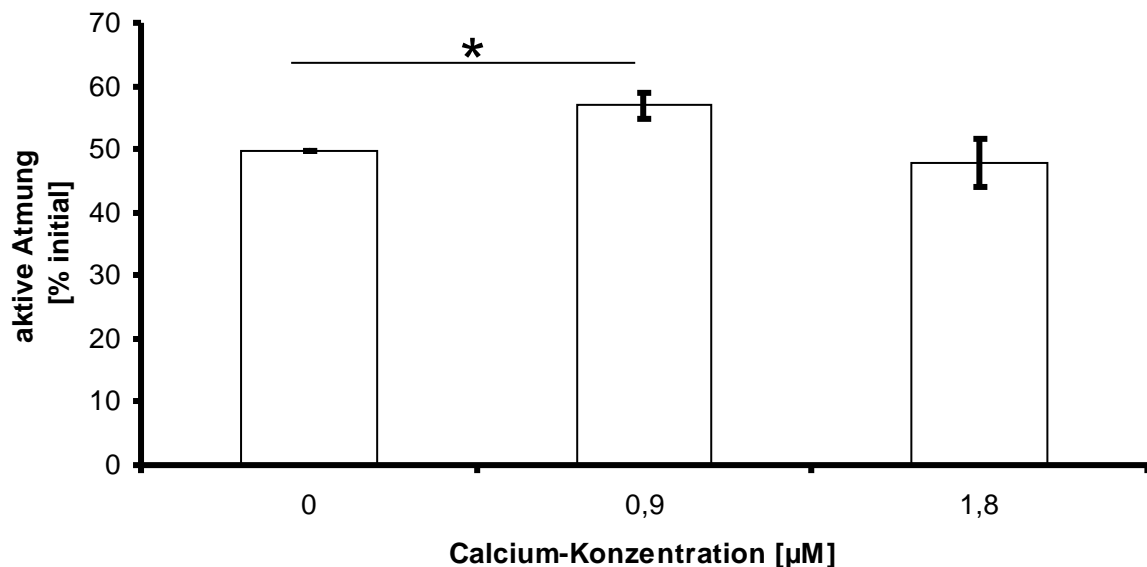


**Abb. 6: Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf das mitochondriale Atmungsverhalten ohne Hypoxie und Reoxygenierung.**

Um den Einfluss der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überflutung auf die Atmung zu prüfen, die *in vivo* bei Ischämie auftritt, wurden die Mitochondrien bei 30 °C im Inkubationsmedium verschiedenen extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ausgesetzt. Das dargestellte Experiment ist typisch für 4 Mitochondrienpräparationen. Calciumionen haben bei 0,9  $\mu\text{M}$  einen protektiven Effekt auf die mitochondriale Atmung, weil hier die höchste Atmungsgeschwindigkeit von 44,6 nmol  $\text{O}_2/\text{mg}/\text{min}$  vorlag. Die Pfeile geben den Zeitpunkt der Zugabe von ADP an, die Zahlen an den Steigungsdreiecken den Betrag der Atmungsgeschwindigkeit in nmol  $\text{O}_2/\text{mg}/\text{min}$ .

### 3.4 Einfluss von extramitochondrialen Calciumionen sowie Hypoxie und Reoxygenierung auf die mitochondriale Atmung

Um den Einfluss von extramitochondrialen Calciumionen sowie Hypoxie und Reoxygenierung auf die Atmung zu untersuchen, wurden die Mitochondrien in Gegenwart von einer von sieben verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (0; 0,3; 0,6; ...; 1,8  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) inkubiert, anschließend 10 min Hypoxie und nachfolgend 5 min Reoxygenierung ausgesetzt und danach das Atmungsverhalten analysiert. Auch unter den hinzugeetretenen Faktoren (Hypoxie und Reoxygenierung) zeigte sich eine protektive Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$ . In einem Bereich von 0,6 bis 1,2  $\mu\text{M}$  wirkte  $\text{Ca}^{2+}$  schützend auf die Atmung, indem die aktive Atmung am wenigsten beeinträchtigt wurde (Abb. 7), am stärksten war dieser Effekt bei 0,9  $\mu\text{M}$ . In Abbildung 7 wurde die Darstellung der Messreihen auf die drei funktionell wesentlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen begrenzt und die Atmungsaktivität in % initial angegeben.

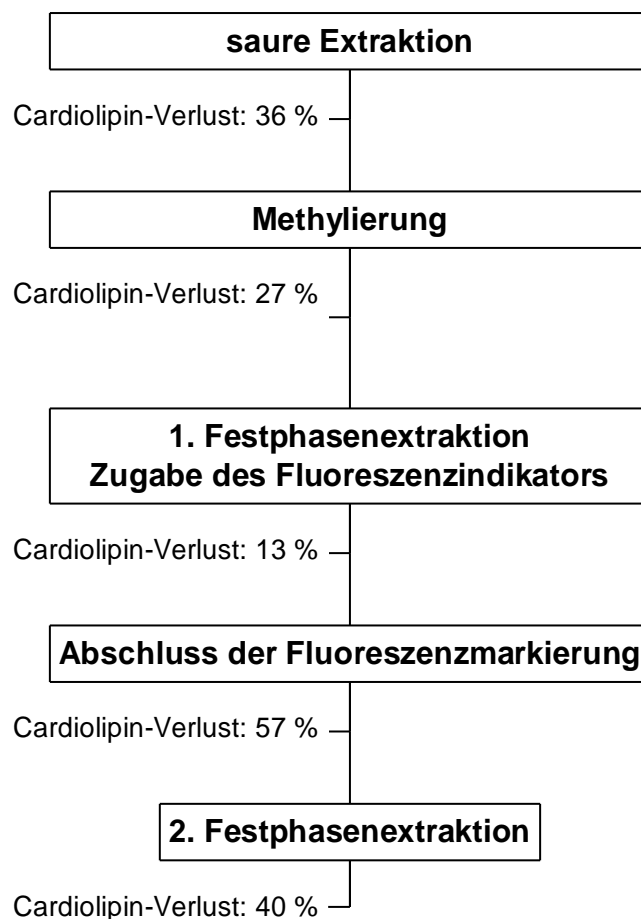


**Abb. 7: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die aktive Atmung nach Hypoxie und Reoxygenierung.** Da die wesentlichen Informationen der Atmungsaktivität bei 0; 0,9 und 1,8  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zu finden waren, wurden alle 7 Messreihen in diesen 3 Punkten zusammengefasst. In dieser Versuchsreihe wurden die Mitochondrien bei 30 °C im Inkubationsmedium 3 verschiedenen extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ausgesetzt und anschließend 10 min Hypoxie und 5 min Reoxygenierung unterzogen. Auch unter Hinzutritt von Hypoxie und Reoxygenierung haben  $\text{Ca}^{2+}$  bei 0,9  $\mu\text{M}$  einen protektiven Effekt auf die mitochondriale Atmung, da hier die Atmungsaktivität am höchsten war. Die mittlere aktive Atmungsgeschwindigkeit betrug  $52 \pm 3$  % initial. Die mit \* gekennzeichnete Paardifferenz erwies sich als signifikant ( $p \leq 0,05$ ).



### 3.5 Analyse der Cardiolipinausbeute durch die Phospholipidextraktion

Um zu analysieren, an welchen Passagen der Lipidextraktion besonders hohe Verluste von Cardiolipin auftreten, wurden während einer Extraktion kommerziellen Cardiolipins nach verschiedenen Etappen des Verfahrens Proben entnommen und deren Phosphatgehalt photometrisch bestimmt (Abb. 8). Weil Cardiolipin als phosphathaltiges Molekül in den Proben vorhanden war, ist der gemessene Phosphatgehalt auf die verbliebene Cardiolipinmenge übertragbar. Ein Molekül Cardiolipin besitzt zwei Phosphatgruppen.

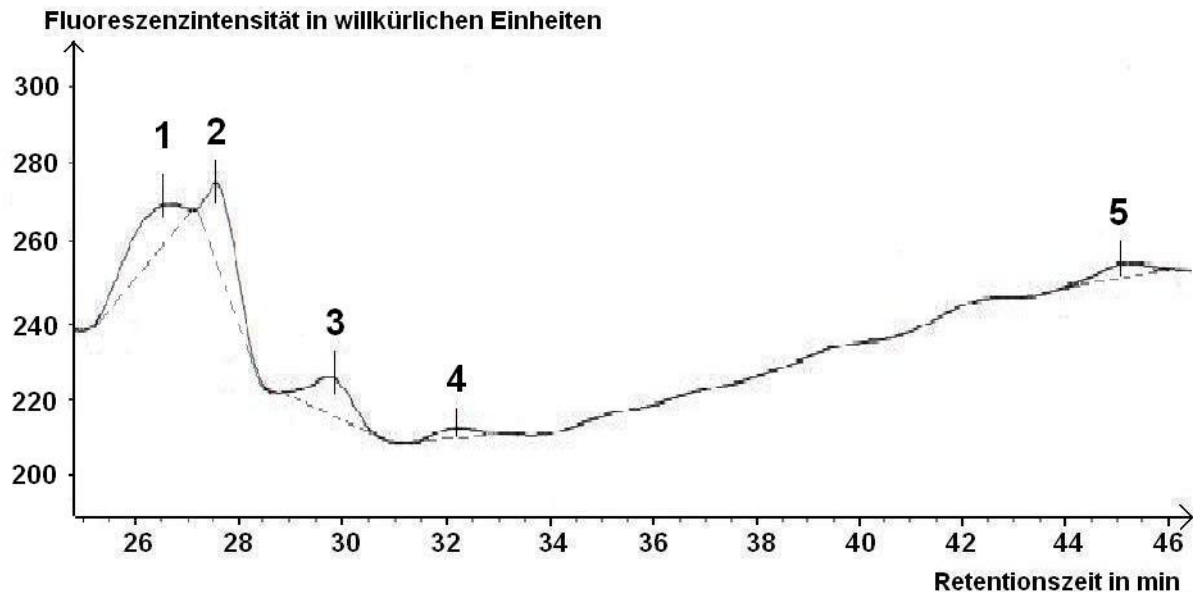


**Abb. 8: Etappen der Lipidextraktion, zwischen denen der Verlust von Cardiolipin mittels einer Phosphatanalyse bestimmt wurde.** Die Zahlenangaben entsprechen dem Anteil des verlorengegangenen Cardiolipins vom vorhergehenden auf den nachfolgenden Schritt. Dabei wurde die Cardiolipinmenge des vorhergehenden Schrittes jeweils 100 % gesetzt. Der größte Verlust von Cardiolipin trat vor und nach der 2. Festphasenextraktion auf.

Die erste Etappe erfasste die saure Extraktion des Cardiolipins und war mit einem Verlust von 36 % des Cardiolipins verbunden. Die zweite Etappe beschrieb den Verlust während der Methylierung und ergab 27 %. Die dritte Etappe erfasst die erste Festphasenextraktion und die Zugabe des Fluoreszenzindikators. Diese beiden Abschnitte erzeugten den geringsten Cardiolipinverlust von 13 %. Danach folgte die verlustreichste Etappe nach Abschluss der Fluoreszenzmarkierung, die eine Reduzierung des Cardiolipins um 57 % hervorrief. Die fünfte Etappe erfasste die zweite Festphasenextraktion, die den zweithöchsten Cardiolipinverlust von 40 % ergab. Trotz dieser beträchtlichen Verluste an Cardiolipin bleiben die ermittelten Werte für den mitochondrialen Cardiolipingehalt aussagekräftig, weil sie immer auf den internen Standard bezogen wurden, der die gleichen Verluste aufwies.

### **3.6 Darstellung von Cardiolipin mittels HPLC**

Während in Abb. 4 auf Seite 28 das Chromatogramm von unbehandelten Rattenherzmitochondrien (ohne Hypoxie) dargestellt wird, zeigt Abb. 9 auf der folgenden Seite ein Chromatogramm einer typischen Probe von Mitochondrien, die 10 min Hypoxie und 5 min Reoxygenierung ohne Zusatz extramitochondrialer Calciumionen unterworfen war. Beim Vergleich der Peak-Flächen beider Chromatogramme wird deutlich, dass der Cardiolipingehalt nach Hypoxie und Reoxygenierung vermindert war. Trotz dieser Verminderung der Peak-Flächen waren die charakteristischen Peaks in allen Messungen deutlich erkennbar und auswertbar. Dazu sei auch erwähnt, dass in beiden Abbildungen die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten zu berücksichtigen ist. Auf eine Auswertung des Verhaltens der einzelnen Cardiolipin-Spezies unter Hypoxie und Reoxygenierung wurde verzichtet.



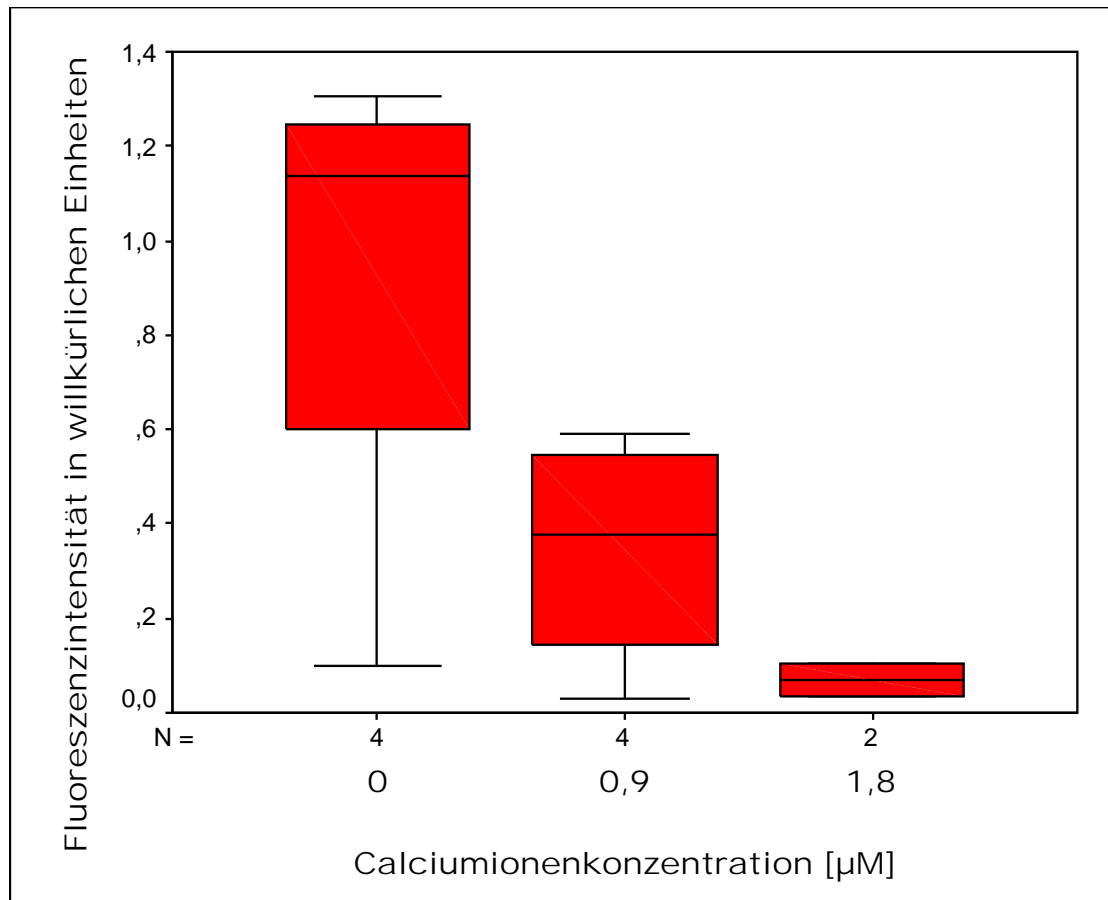
**Abb. 9: HPLC-Chromatogramm einer Cardiolipinprobe.**

Das HPLC-Chromatogramm zeigt das Fluoreszenzsignal einer Mitochondrienprobe nach 10 min Hypoxie und 5 min Reoxygenierung ohne Zusatz von extramitochondrialen Calciumionen in Abhängigkeit von der Retentionszeit. Die markierten Peaks repräsentieren die molekularen Spezies des Cardiolipins: Trilinoleoyl-linolenoyl-Cardiolipin (Peak 1), Tetralinoleoyl-Cardiolipin (Peak 2), Trilinoleoyl-oleoyl-Cardiolipin (Peak 3) und Dilinoleoyl-dioleoyl-Cardiolipin (Peak 4). Der interne Standard (Tetrastearoyl-Cardiolipin) findet sich in Peak 5. Die Fläche unter den Peaks entspricht der gefundenen Menge des jeweiligen Stoffes. Die gestrichelte Linie entspricht der von der Software errechneten Basislinie.

### 3.7 Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung sowie $\text{Ca}^{2+}$ auf den mitochondrialen Cardiolipingehalt

Um den Einfluss von Hypoxie und Reoxygenierung sowie des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels auf den Cardiolipingehalt zu untersuchen, wurde Cardiolipin aus den entsprechend behandelten Mitochondrien extrahiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Mittels der HPLC wurde dann die Intensität der Fluoreszenz aufgezeichnet und die Peak-Flächen der enthaltenen Cardiolipin-Spezies und des internen Standards ermittelt. Das Integral war das Maß für den Cardiolipingehalt. Der Cardiolipingehalt der Probe wurde nach Gleichung 1 berechnet und anschließend auf den Proteingehalt der Probe bezogen. Es ergab sich eine mittlere Cardiolipinmenge von  $86,07 \pm 4,41$  nmol pro mg Protein in den Proben ohne  $\text{Ca}^{2+}$  (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $N = 4$ ). Dabei zeigte sich eine Senkung des Cardiolipingehalts mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Abb. 10). Die Unterschiede zwischen 0 und  $0,9 \mu\text{M}$  sowie 0 und  $1,8 \mu\text{M}$  erwiesen sich als signifikant. Während es bei steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

zu einem Optimum der Atmungsaktivität bei  $0,9 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  kam (Abb. 7 auf Seite 32), zeigte sich in diesem Experiment kein Optimum bezüglich des Cardiolipingehalts.



**Abb. 10: Abhängigkeit des Cardiolipingehaltes von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.**

Um den Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf den Cardiolipingehalt zu prüfen, wurden isolierte Mitochondrien während 10 min Hypoxie und 5 min Reoxygenierung drei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln ausgesetzt und mittels der HPLC der Cardiolipingehalt bestimmt. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert mit der gefundenen Cardiolipinmenge. Bei dieser Analyse wurden Paarvergleiche entsprechend der Bonferroni-Methode erstellt [5].

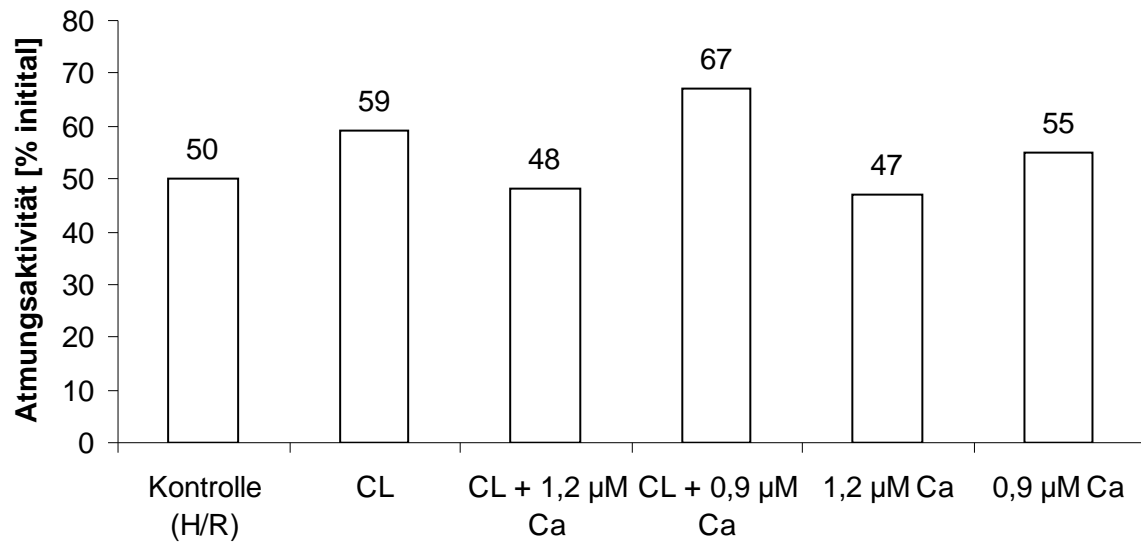
### 3.8 Einfluss von exogenem Cardiolipin und $\text{Ca}^{2+}$ auf die Schädigung der Atmung durch Hypoxie und Reoxygenierung

Über die im Rahmen der Arbeit erhobenen Befunde hinaus sollte in ersten vorläufigen Experimenten die Hypothese überprüft werden, dass ein Verlust an funktionellem Cardiolipin durch Hypoxie und Reoxygenierung in Verbindung mit erhöhter extramitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen an der Einschränkung der mitochondrialen ATP-Synthese beteiligt ist. Zur Darstellung des prinzipiellen Effekts wurden die mit Hypoxie, Reoxygenierung und  $\text{Ca}^{2+}$  behandelten Mitochondrien mit exogenem Cardiolipin bei  $30^\circ\text{C}$  für 5 min in einer abgedunkelten Messzelle inkubiert. Das Cardiolipin wurde in Form von  $40 \mu\text{l}$  eines Gemisches aus kommerziellem

Cardiolipin und Ethanol (1:1 v/v) zugegeben. An dieser Stelle der Untersuchungen wurde bewusst auf eine Analyse der Konzentrationsabhängigkeit und der Aufnahmekinetik verzichtet. Dies soll Gegenstand weiterführender über den Rahmen der Arbeit hinausgehender Untersuchungen sein.

Nach 5 min Inkubation wurde die Atmungsgeschwindigkeit gemessen. Dabei ergab die Kontrollmessung, in der nur das Lösungsmittel Ethanol zugegeben wurde, dass Ethanol allein die Atmungsaktivität geringfügig reduzierte. Die Atmungsaktivität unter Ethanol wurde 100 % gesetzt, um in den nachfolgenden Experimenten nur den reinen Effekt von exogenem Cardiolipin und  $\text{Ca}^{2+}$  zu erfassen.

Im ersten Versuch wurde zunächst der reine Effekt von Hypoxie und Reoxygenierung auf die Atmungsaktivität untersucht. Dabei wurde eine Reduktion auf 50 % festgestellt (Abb. 1). Im zweiten Versuch wurden die Hypoxie-geschädigten Mitochondrien mit dem Cardiolipin-Ethanol-Gemisch versetzt. Hier zeigte Cardiolipin eine protektive Wirkung auf die Atmungsaktivität und erhöhte diese auf 59 %. Es konnte also durch die Zugabe exogenen Cardiolipins der Verschlechterung der Atmungsgeschwindigkeit durch Hypoxie und Reoxygenierung entgegen gewirkt werden. Im dritten Versuch wurde dann neben Cardiolipin auch  $1,2 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  zugegeben. Wie erwartet, schädigten Calciumionen in dieser hohen Konzentration die Atmung zusätzlich, sodass die Atmungsaktivität unter das Niveau von reiner Hypoxie auf 48 % sank. Im vierten Versuch wurde dann die Konzentration der Calciumionen auf das in Kapitel 3.3 ermittelte Optimum von  $0,9 \mu\text{M}$  eingestellt. Erneut erwies sich diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als weniger schädlich, sodass die Atmungsaktivität auf 67 % gesteigert wurde. Im fünften und sechsten Versuch wurde den Ischämie-geschädigten Herzmitochondrien lediglich  $\text{Ca}^{2+}$  in schädlicher ( $1,2 \mu\text{M}$ ) und protektiver ( $0,9 \mu\text{M}$ ) Konzentration angeboten, um deren Wirkungen ohne das exogene Cardiolipin in den Versuchen drei und vier betrachten zu können. Beim Vergleich zwischen drittem und fünftem Versuch fällt auf, dass Cardiolipin die Atmungsaktivität von Mitochondrien, die durch  $1,2 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  geschädigt wurden, kaum noch steigern konnte. Der Vergleich zwischen viertem und sechstem Versuch zeigt, dass bei der protektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $0,9 \mu\text{M}$  eine deutlichere Steigerung der Atmung durch Cardiolipin erfolgte.



**Abb. 11: Versuche zur Substitution von exogenem Cardiolipin nach Hypoxie und Reoxygenierung unter Berücksichtigung von Calciumionen.**

Isolierte Rattenherzmitochondrien wurden im Inkubationsmedium bei 30 °C einer Hypoxie und Reoxygenierung sowie nach Zugabe von ADP verschiedenen Bedingungen ausgesetzt ( $\text{Ca}^{2+}$ , exogenes Cardiolipin in einer Ethanol­lösung) und ihre Atmungsgeschwindigkeit vor und nach Zugabe der Stoffe gemessen. Die Änderung des Wertes wurde in % angegeben. H/R = Hypoxie und Reoxygenierung, CL = Cardiolipin in Ethanol­lösung, Ca =  $\text{Ca}^{2+}$

## **4 Diskussion**

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Rolle von Cardiolipin auf die Funktion von Herzmitochondrien bei Ischämie und Reperfusion zu untersuchen. Für diese Untersuchungen wurden isolierte Herzmitochondrien benutzt. Um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg *in vivo* zu simulieren, der während einer Ischämie im Herzen in Folge des Ausfalls von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern [15] auftritt, wurde die extramitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium variiert. Hypoxie und Reoxygenierung blieben bei allen Versuchen von gleicher kurzer Zeitdauer. Andere Untersuchungen zeigten [24], dass sich die Pathophysiologie von Mitochondrien unter kurzer und langer Ischämie erheblich unterscheidet. So sind zum Beispiel bei kurzer Ischämie die Komplexe I und V der Atmungskette sowie der Adeninnukleotidtransporter geschädigt, während bei langer Ischämie zusätzlich die Enzyme distal von Komplex I, z. B. die Cytochromoxidase, versagen und damit die oxidative Phosphorylierung einschränken.

Durch diese Unterschiede kann auch eine unterschiedliche Stoffwechsellage der Herzmuskelzelle zwischen kurzer und langer Ischämie angenommen werden. Weil es bereits nach 10 min Hypoxie zu strukturell nachweisbaren Schäden in den Mitochondrien kommt [49], jedoch die meisten der bisher verfügbaren Studien zum Cardiolipingehalt eine Dauer von 30 min für Hypoxie in Rattenherzmitochondrien vorsahen, wurde in eigenem Experiment überprüft, ob auch diese kürzere Hypoxiedauer ausreicht, den Cardiolipingehalt zu reduzieren.

Die Atmungsaktivität der Mitochondrien wurde als der wesentliche funktionelle Parameter ohne und nach Hypoxie und Reoxygenierung bestimmt. Einen Hinweis auf den zugrunde liegenden Schädigungsmechanismus brachte die Bestimmung ihres Cardiolipingehalts bei Hypoxie und Reoxygenierung in Verbindung mit erhöhten extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen.

### **4.1 Einfluss von Hypoxie, Reoxygenierung und $\text{Ca}^{2+}$ auf die mitochondriale Atmung**

Die vorliegenden *In-vitro*-Experimente ergaben, dass Hypoxie und Reoxygenierung die Herzmitochondrien funktionell schädigten. Dies wurde anhand gesunkener Atmungsaktivität belegt. Hingegen steigerte  $\text{Ca}^{2+}$  die Atmungsaktivität bis zu einer Konzentration von  $0,9 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen verringerte sich

dieser positive Effekt auf die Atmung. Solche protektiven Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Atmung im mikromolaren Bereich wurden zuvor schon in Rattenlebermitochondrien beschrieben [43]. In Versuchen an Großhirnen von Ratten konnte ein solcher protektiver Effekt jedoch bisher nicht nachgewiesen werden [42]. Dies lag aber vermutlich daran, dass in dieser Studie die Abstände der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sehr groß gewählt wurden (0; 1,5 und 3,5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) und so der mögliche protektive Effekt zwischen 0 und 1,5  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  nicht erfasst wurde.

Jedoch spiegelte sich die gefundene protektive Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  nur bezüglich der Atmungsaktivität und nicht im Gehalt an endogenem Cardiolipin wider. Der Cardiolipingehalt sank mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Mögliche Gründe dafür können in anderen Studien gefunden werden:

1. Die beobachtete Stimulation der Atmung durch  $\text{Ca}^{2+}$  könnte auf eine Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Dehydrogenasen des Citratzyklus zurückgeführt werden [28], z.B. der Isocitrat-dehydrogenase,  $\alpha$ -Ketoglutarat-dehydrogenase und Pyruvat-dehydrogenase. Der Citratzyklus wurde beschleunigt und stimulierte den Elektronentransport durch die Atmungskette.
2. Die geringere Reduktion der Atmungsaktivität bei 0,9  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  könnte auch durch die Verstärkung der antioxidativen Kapazität durch  $\text{Ca}^{2+}$  in dieser Konzentration erklärt werden [44]: Calciumionen stimulieren z.B. die Mangan-Superoxiddismutase und die Glutathionperoxidase, welche die Atmungskette vor oxidativem Stress bei Hypoxie und Reoxygenierung schützen.
3. Cardiolipin steht im Mitochondrium im Überschuss zur Verfügung, sodass der Effekt durch Calciumionen nicht relevant ist (eigene Hypothese).

## 4.2 Bestimmung des mitochondrialen Cardiolipingehalts

Die Bestimmung des mitochondrialen Cardiolipingehalts gestaltete sich problematisch, weil Cardiolipin zahlreiche Proteinbindungen eingeht, in denen es teilweise maskiert vorliegt [17], sodass es erst durch aufwändige Extraktionsverfahren möglich war, Cardiolipin anzureichern und zu bestimmen. Es musste ein Kompromiss zwischen Methoden mit akzeptabler Kontamination des Cardiolipins mit anderen Phospholipiden und Methoden, welche die Gefahr einer Zerstörung des gewonnenen Cardiolipins in sich bergen, gefunden werden.



Die gewählte Methode der Phospholipidextraktion nach Bligh und Dyer [6] und der anschließenden HPLC-Analyse zur Bestimmung des mitochondrialen Cardiolipingehalts wurde in einer für Cardiolipin modifizierten Variante von Schlame et al. [48] übernommen und im Labor etabliert. Um auch den Verlust des Cardiolipins *während* der Extraktionsmethode in den gemessenen Cardiolipingehalt einbeziehen zu können, wurde erstens ein interner Standard mitgeführt, der die gleichen Verluste wie die Proben erlebte, und zweitens das gesamte Verfahren in 5 Etappen einer Verlustanalyse unterzogen. Durch die Verlustanalyse ergibt sich die Möglichkeit, für zukünftige Lipidextraktionen die verlustreichsten Schritte zu optimieren und so die Ausbeute weiter zu erhöhen. Zu den verlustreichsten Schritten zählten die Fluoreszenzmarkierung und die zweite Festphasenextraktion. Bei der Fluoreszenzmarkierung sollte zukünftig noch mehr auf einen völligen Ausschluss von Wasser geachtet werden, während sich bei der zweiten Festphasenextraktion eine starke Verlangsamung der Elution mittels Diethylether-Ethanol (95:5 v/v) empfiehlt, um Cardiolipin stärker anreichern zu können. Die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse bezüglich des Cardiolipingehalts sind trotz der genannten Verluste durch die Extraktion aussagekräftig, da sie immer auf den internen Standard bezogen wurden, der die gleichen Verluste aufwies.

#### **4.3 Rolle des Cardiolipingehalts während Hypoxie und Reoxygenierung**

Vorübergehende Ischämie im Herzmuskel führt zur Verringerung des Gehalts an dem Phospholipid Cardiolipin [37]. Dieser Verlust wird auf die Peroxidation durch freie Radikale, Peroxide und reaktive Sauerstoffspezies zurückgeführt, die während der Ischämie von den Atmungskettenenzymen vermehrt gebildet werden. Die antioxidative Abwehr der Mitochondrien versagt, weil sie zum einen die plötzliche hohe Anzahl an freien Radikalen nicht mehr bewältigen kann und zum anderen selber durch die Ischämie in Mitleidenschaft gezogen wird [11]. Als Hauptquelle der freien Radikale gilt dabei Komplex III der Atmungskette, der in unmittelbarer Nachbarschaft zu Cardiolipin in der inneren Membran liegt [9]. Diese Hypothese wurde durch den Befund gestützt, dass eine Blockade des Elektronenflusses zu Komplex III mittels Rotenon den Cardiolipingehalt während einer Ischämie bewahren konnte [23], weil die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies an diesem Enzym der Atmungskette verringert wurde. Der Verlust von funktionellem Cardiolipin

während Hypoxie und Reoxygenierung konnte auf die erhöhte Radikalkonzentration (z.B. Superoxidanionen, Hydroxylradikale) zurückgeführt werden [37]. Allerdings schwanken die in der Literatur angegebenen Daten zum Cardiolipinverlust erheblich. Nach 30 min Ischämie und 15 min Reperfusion sank der Cardiolipingehalt in dieser Studie um 50 %. In einer anderen Studie mit nur geringfügig längerer Ischämie (45 min) und Reperfusion (30 min) sank der Cardiolipingehalt nur um 9 % [24].

Als Erklärung für diese deutlich unterschiedlichen Ergebnisse könnte die verschiedenartige Herkunft der untersuchten Herzen (Ratte [37] vs. Kaninchen [24]) verantwortlich sein. Außerdem wurden die Mitochondrien anders isoliert, da die Autoren der zweiten Studie [24] noch die Effekte zwischen subsarcolemmalen und interfibrillären Mitochondrien erfassen wollten. Darüber hinaus wurden auch verschiedene Extraktionsmethoden zur Bestimmung des Cardiolipingehalts verwendet (Methode nach Bligh und Dyer [37] vs. Methode nach Folch [24]).

Erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffradikale wurden nachgewiesen bei Alkoholismus [4], Alterung [16], hyperbarer Sauerstoffvergiftung [53], chronisch-degenerativen Krankheiten (incl. des Myokard) [26], Krebs, Morbus Alzheimer und chronischen Entzündungen [54]. Dadurch ergeben sich für viele weitere Krankheiten, bei denen ein erhöhter Gehalt an freien Radikalen vorliegt, Anhaltspunkte, dass Cardiolipin eine bedeutende Rolle in der Pathogenese spielen könnte. Für die Schilddrüsenunterfunktion bei Ratten ist bereits ein verringerter Cardiolipingehalt nachgewiesen worden [36].

Dennoch bleibt eine Lücke in dieser Theorie, weil in den bisherigen Studien [24, 37] der Cardiolipingehalt hauptsächlich während der Ischämiephase absinkt und nicht in der Reoxygenierungsphase [24], obwohl in der Reoxygenierungsphase die meisten freien Radikale gebildet werden und auch eine massive Lipidperoxidation im Mitochondrium stattfindet [11, 22, 37]. Somit müsste der Cardiolipingehalt in der Reoxygenierungsphase am meisten sinken, wenn die Lipidperoxidationen die Hauptursache für den Cardiolipinverlust wäre. In einer Studie wurde sogar während der Reoxygenierungsphase überhaupt kein weiterer Abfall des Cardiolipins festgestellt [24].

Eine exakte Bestimmung des mitochondrialen Cardiolipins in Abwesenheit von Sauerstoff (ohne die Effekte der Reoxygenierung) scheint nahezu unmöglich, weil während der nachfolgenden obligaten, zeitintensiven und technisch aufwändigen Aufarbeitung der Proben zur Bestimmung des Cardiolipingehalts unweigerlich

Sauerstoff an die Mitochondrien tritt. Auch der Einsatz von butyliertem Hydroxytoluol (BHT) und stetes Durchspülen der Lösungsmittel mit Argon können nur begrenzt die mögliche Autoxidation der Proben während der Aufarbeitung vermindern.

Da in Studien lichtmikroskopisch beobachtet wurde, dass hypoxische Herzmuskelzellen nach Sauerstoffzutritt geradezu „explosionsartig“ anschwellen und strukturelle Schäden zeigen [13, 18], muss angenommen werden, dass auch während dieses Anschwellens die Hauptmenge an freien Radikalen mit Hilfe des eindringenden Sauerstoffs gebildet wird und diese durch ihre zerstörerischen Oxidationsprozesse auch den Cardiolipingehalt in kurzer Zeit rasch senken.

Daraus schlussfolgernd würden die Cardiolipinmesswerte von Untersuchungen, die „nur die Hypoxie-Situation beschreiben“, immer schon den hauptsächlichen Effekt der Reoxygenierung enthalten und die Messwerte, die sich „nur auf die Reoxygenierung“ beziehen, lediglich die Effekte der „ausklingenden Explosion“ erfassen und deswegen auch wahrscheinlich zu niedrige Werte für die Reoxygenierung ergeben. Auf diese Weise löst sich die oben beschriebene Frage, in welcher Phase nun mehr Cardiolipin verloren geht, zu Gunsten der Reoxygenierung auf. Es ist bemerkenswert, dass Hypoxie und Reoxygenierung einerseits und  $\text{Ca}^{2+}$  andererseits unterschiedlich auf die Funktion (Atmung) und den Cardiolipingehalt wirken. Offensichtlich überkompensiert die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Protektion der Atmung bei Hypoxie und Reoxygenierung die Funktionseinschränkung (Elektronenfluss) durch den Cardiolipinverlust. Cardiolipin liegt wahrscheinlich im Überschuss vor, sodass erst größere Verluste an Cardiolipin bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auftreten müssen.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob ein Ersatz des verlorenen endogenen Cardiolipins durch exogenes Cardiolipin die Atmungsaktivität verbessern kann, wie es in anderen Studien bereits gelang [33, 34, 37]. Im Gegensatz zu den genannten Studien wurden Cardiolipin-Liposomen zur Einschleusung in die Mitochondrien nicht durch Bestrahlung des Cardiolipins erzeugt, weil durch die dazu notwendige längere Vorinkubation unter 37 °C eine weitere thermisch-bedingte Schädigung der Mitochondrienaktivität befürchtet wurde, sondern sie wurde durch die Gegenwart einer Ethanollösung erreicht. Auch mit dieser Methode gelang eine Verbesserung der Atmungsaktivität. Dadurch ist eine funktionelle Bedeutung des Cardiolipinverlustes belegt. Im Gegensatz zur Ischämie konnten in den eigenen

Untersuchungen als wesentliche Faktoren für einen Cardiolipinverlust  $\text{Ca}^{2+}$ , Hypoxie und Reoxygenierung nachgewiesen werden.

#### 4.4 Schlussfolgerungen

Die in den durchgeführten Experimenten simulierte Hypoxie und Reoxygenierung am Herzen kommt beim Menschen beispielsweise während eines Angina-pectoris-Anfalls oder eines Myokardinfarkts vor. Da in dieser Studie ein *In-vitro*-Modell verwendet wurde, konnten sich die isolierten Mitochondrien während des Sauerstoffmangels fast in eine Anoxie begeben, während *in vivo* immer noch Sauerstoff aus der Umgebung in das Ischämieareal diffundieren kann. Die Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen sollte aber dennoch möglich sein, weil der Aufbau der Herzmitochondrien und des enthaltenen Cardiolipins zwischen Ratte und Mensch sehr ähnlich ist. In der Struktur des Cardiolipins existieren Unterschiede in der Zusammensetzung der Fettsäuren [17], deren funktionellen Bedeutung noch nicht vollends geklärt werden könnte.

Darüber hinaus zeigte sich, dass der Anteil des Cardiolipins an allen Phospholipiden sowohl im menschlichen Herz, als auch im Herz einer 3 Monate alten Ratte (wie in dieser Studie verwendet) gemeinsam bei etwa 15 % liegt [17]. Mit den geringfügigen Unterschieden im Aufbau des Cardiolipins zwischen Ratte und Mensch wird man sich aber wahrscheinlich arrangieren müssen, da es ethisch nicht vertretbar wäre, solche Experimente am menschlichen Herzen durchzuführen.

Wegen der eingangs beschriebenen Bedeutung des akuten Myokardinfarkts als Todesursache empfiehlt es sich zu prüfen, ob die Behandlung am Patienten nach stattgefundenem Ereignis sich noch intensiver als bisher der Regenerierung des Herzgewebes widmen sollte. Die bereits empfohlenen Maßnahmen [1], wie die Gabe von Sauerstoff, Nitraten, Acetylsalicylsäure und Heparin, setzen ihren Fokus eher bei der Wiederherstellung der Durchblutung der Koronargefäße.

Eine denkbare Maßnahme zur direkten Regeneration des Herzmuskelgewebes ist eine Auffüllung des verlorenen Cardiolipins zur Verbesserung der Herzleistung. Hypothetisch ergeben sich Ansatzpunkte erstens in der Substitution von Cardiolipin oral z.B. in Form von Gelatine-Weichkapseln oder zweitens in einer Steigerung der Cardiolipinsynthese. Das für die Synthese zuständige Enzym Cardiolipinsynthase ist in seiner Aktivität weniger von der Anwesenheit seiner Substrate (z.B.

Phosphatidylglycerol) abhängig, sondern eher von den energieträchtigen Phosphaten ATP und CTP [46]. Eine Studie an Rattenherzen zeigte, dass diese beiden Verbindungen durch Hypoxie in ihrer Konzentration vermindert wurden [10]. Da bisher jedoch keine Möglichkeit besteht, ATP und CTP direkt zu substituieren, um die Cardiolipinsynthese anzuregen, kann nur noch versucht werden, die hemmenden Faktoren der Cardiolipinsynthese auszuschalten. Insbesondere einige bivalente Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  hemmen das Enzym [29].

Wie bereits erwähnt, erhöht sich während der Ischämie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und senkt ja auch den Cardiolipingehalt, wie diese Studie zeigt. Calciumionen können Cardiolipin dabei auch nicht-oxidativ durch Aktivierung der mitochondrialen Phospholipase  $\text{A}_2$  schädigen, welche Cardiolipin in Lysocardiolipine überführt [47]. Hier zeigt sich wieder einmal erneut, welche bedeutsame Rolle dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel bei der Ischämie zukommt. Somit könnte eine Verringerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels im Herzen ebenso zu einer Steigerung des Cardiolipingehalts beitragen.

## **5 Zusammenfassung**

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den funktionellen Einfluss von Cardiolipin auf Herzmitochondrien zu untersuchen, die durch Hypoxie, Reoxygenierung und  $\text{Ca}^{2+}$  geschädigt wurden. Die Atmungsaktivität der Mitochondrien wurde als der wesentliche funktionelle Parameter vor und nach jeder Behandlung bestimmt. Hypoxie und Reoxygenierung wurden über alle Experimente in ihrer kurzen Dauer von 10 min (Hypoxie) und 5 min (Reoxygenierung) konstant gehalten.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel wurde in sieben Konzentrationen im Bereich von 0 bis 1,8  $\mu\text{M}$  variiert. Für jede der sieben  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wurde ein Mitochondrienansatz erstellt, der einer Hypoxie mit nachfolgender Reoxygenierung unterzogen wurde. Anschließend wurde Cardiolipin nach der Methode von Bligh und Dyer aus den Mitochondrien extrahiert. Diese Extraktionsprozedur in der Variante nach Schlame et al. wurde noch einer Verlustanalyse unterzogen, um zukünftigen Untersuchungen eine Optimierung des Verfahrens zu ermöglichen.

Nachdem das Cardiolipin extrahiert und methyliert vorlag, wurde es mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und sein Gehalt mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion bestimmt. Dabei war festzustellen, dass der Cardiolipingehalt mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration absank. Hingegen erhöhte sich die Atmungsaktivität zunächst mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bis zur mittleren Konzentration von 0,9  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  und sank anschließend mit weiter ansteigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wieder ab. Eine solche „protektive  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration“ wurde schon an Lebermitochondrien ermittelt. Sie beruht wahrscheinlich zum größten Teil auf der  $\text{Ca}^{2+}$ -bedingten Stimulation mitochondrialer Dehydrogenasen. In einem engen Bereich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration um 0,9  $\mu\text{M}$  scheint dieser stimulierende Effekt die durch Cardiolipinverlust bedingte Einschränkung des Elektronentransports in der Atmungskette überzukompensieren. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Schutzmechanismus von Herzmitochondrien.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob das durch die Hypoxie und Reoxygenierung zerstörte Cardiolipin durch exogenes kommerzielles Cardiolipin wieder aufgefüllt und die Atmungsaktivität positiv beeinflusst werden konnte. Tatsächlich gelang eine Steigerung der Atmung, sodass sich Cardiolipin als ein wichtiger funktioneller Baustein der Atmungskette herausstellte.

Daher wurde angeregt, nach ähnlichen Sauerstoffmangel-Situationen am menschlichen Herzen, wie dem Myokardinfarkt, mit geeigneten Maßnahmen den Cardiolipingehalt zu erhöhen, um die Erholung der Herzfunktion zu fördern und die Mortalität zu senken.

## **6 Literatur** (Literatur nach der alphabetischen Reihenfolge der Autoren geordnet)

- 1            Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF): Leitlinien Kardiologie: Akuter Herzinfarkt in der Prähospitalphase, <http://leitlinien.net>, 2006
  
- 2            Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F, Louisot P: Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. J. Biol. Chem. 265(31).18797-18802 (1990)
  
- 3            Awasthi YC, Berezney R, Ruzicka FJ, Crane FL: Action of phospholipase A on mitochondrial cristae. Biochimica et Biophysica Acta 189. 457-460 (1969)
  
- 4            Bailey SM, Pietsch EC, Cunningham CC: Ethanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complexes I and III. Free Radic. Biol. Med. 27. 891-900 (1999)
  
- 5            Bland JM, Altman DG: Multiple significance tests: The Bonferroni method. Br. med. J. 310. 170 (1995)
  
- 6            Bligh FG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37. 911-917 (1959)
  
- 7            Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R, Brown GC: Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. J. Mol. Cell. Cardiol. 35(4). 357-366 (2003)
  
- 8            Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72. 248-254 (1976)
  
- 9            Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ: Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. J. Biol. Chem. 278(38). 36027-36031 (2003)
  
- 10          Cheng P, Hatch GM: Inhibition of cardiolipin biosynthesis in the hypoxic rat heart. Lipids 30(6). 513-519 (1995)



- 11 Das DK, Maulik N: Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol.* 233. 601-610 (1994)
- 12 Fabiato A, Fabiato F: Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol. (Paris)* 75. 463-505 (1979)
- 13 Ganote CE, Worstell J, Iannotti JP, Kaltenbach JP: Cellular swelling and irreversible myocardial injury. Effects of polyethylene glycol and mannitol in perfused rat hearts. *Am. J. Pathol.* 88(1). 95-118 (1977)
- 14 Goormaghtigh E, Martin I, Vandenbranden M, Brasseur R, Ruyschaert JM: Secondary structure and orientation of a chemically synthesized mitochondrial signal sequence in phospholipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31.158(2). 610-616 (1989)
- 15 Greene EL, Paller MS: Calcium and free radicals in hypoxia/reoxygenation injury of renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 266. F13-F20 (1994)
- 16 Harman D: The free radical theory of aging. *Antioxid. Redox. Signal* 5. 557-561 (2003)
- 17 Hoch FL: Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. Biophys. Acta* 1113. 71-133 (1992)
- 18 Jennings RB, Ganote CE, Kloner RA, Whalen DA, Hamilton DG: Explosive swelling of myocardial cells irreversibly injured by transient ischemia. *Recent Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab.* 6. 405-413 (1975)
- 19 Jiang F, Gu Z, Granger J, Greenberg ML: Cardiolipin synthase expression is essential for growth at elevated temperature and is regulated by factors affecting mitochondrial development. *Mol. Microbiol.* 31. 373-379 (1991)
- 20 Jiang F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, Pfanner N, Greenberg ML: Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 275(29). 22387-22394 (2000)

- 21 Kates M, Syz JY, Gosser D, Haines TH: pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 2'-deoxy analogue. *Lipids* 28: 877-882 (1993)
- 22 Lagerwall K, Madhu B, Daneryd P, Schersten T, Soussi B: Purine nucleotides and phospholipids in ischemic and reperfused rat skeletal muscle: effect of ascorbate. *Am. J. Physiol.* 272. H83-H90 (1997)
- 23 Lesnefsky EJ, Chen Q, Moghaddas S, Hassan MO, Tandler B, Hoppel CL: Blockade of Electron Transport during Ischemia Protects Cardiac Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279(46). 47961-47967 (2004)
- 24 Lesnefsky EJ, Chen Q, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hassan MO, Tandler B, Hoppel CL: Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287(1). H258-H267 (2004)
- 25 Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hoppel CL: Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280(6). H2770-2778 (2001)
- 26 McCord JM: Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook. *Free Radic. Biol. Med.* 4. 9-14 (1988)
- 27 McCormack JG, Denton RM: Influence of calcium ions on mammalian intramitochondrial dehydrogenases. *Methods Enzymol.* 174. 95-118 (1989)
- 28 McCormack JG, Denton RM: The role of Ca<sup>2+</sup> ions in the regulation of intramitochondrial metabolism and energy production in rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 89(2). 121-125 (1989)
- 29 McMurray WC, Jarvis EC: Partial purification of diphosphatidylglycerol synthetase from liver mitochondrial membranes. *Can. J. Biochem.* 58(10).771-776 (1980)
- 30 Mueller M, Brandenburg K, Dedrick R, Schromm AB, Seydel U: Phospholipids inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced cell activation: a role for LPS-binding protein. *J. Immunol.* 174(2).1091-1096 (2005)

- 31 O'Brien PJ: Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds, and nucleophiles. *Can. J. Biochem.* 47(5). 485-492 (1969)
- 32 Pangborn MC: Isolation and purification of serologically active phospholipid from beef heart. *J. Biol. Chem.* 143. 247-256 (1942)
- 33 Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM: Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 286. 135-141 (2002)
- 34 Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Venosa N, Serena D, Ruggiero FM: Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* 27.(1-2) 42-50 (1999)
- 35 Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Venosa N, Serena D, Ruggiero FM: Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart. *Circ. Res.* 94(1). 53-59 (2004)
- 36 Paradies G, Petrosillo G, Ruggiero FM: Cardiolipin-dependent decrease of cytochrome c oxidase activity in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1319. 5-8 (1997)
- 37 Petrosillo G, Ruggiero FM, Venosa N, Paradies G: Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB Journal* 17. 714-716 (2003)
- 38 Reynafarje B, Costa LE, Lehninger AL: O<sub>2</sub> solubility in aqueous media determined by a kinetic method. *Anal. Biochem.* 145. 406-418 (1985)
- 39 Robinson NC, Strey F, Talbert L: Investigation of the essential boundary layer phospholipids of cytochrome c oxidase using Triton X-100 delipidation. *Biochemistry* 19(16). 3656-3661 (1980)
- 40 Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A: Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5(5). 494-496 (1970)

- 41 Schaller H, Letko G, Kunz W: Influence of  $Mg^{2+}$ -ions on the properties of rat heart mitochondria in dependence on the preparation. *Acta biol. med. germ.* 37. 31-38 (1978)
- 42 Schild L, Huppelsberg J, Kahlert S, Keilhoff G, Reiser G: Brain mitochondria are primed by moderate  $Ca^{2+}$  rise upon hypoxia/reoxygenation for functional breakdown and morphological disintegration. *J. Biol. Chem.* 11. 278. 25454-25460 (2003)
- 43 Schild L, Plumeyer F, Reinheckel T, Augustin W: Micromolar Calcium prevents isolated rat liver mitochondria from anoxia-reoxygenation injury. *Biochemistry and Molecular Biology International* 43. 35-45 (1997)
- 44 Schild L, Plumeyer F, Reiser G:  $Ca^{2+}$  rise within a narrow window of concentration prevents functional injury of mitochondria exposed to hypoxia/reoxygenation by increasing antioxidative defence. *FEBS J.* 272(22). 5844-5852 (2005)
- 45 Schlame M, Hostetler KY: Solubilization, purification, and characterization of cardiolipin synthase from rat liver mitochondria. Demonstration of its phospholipid requirement. *J. Biol. Chem.* 25. 266(33). 22398-22403 (1991)
- 46 Schlame M, Rua D, Greenberg ML: The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research.* 39. 257-288 (2000)
- 47 Schlame M, Rüstow B: Lysocardiolipin formation and reacylation in isolated rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 272. 589-595 (1990)
- 48 Schlame M, Shanske S, Doty S, König T, Sculco T, DiMauro S, Blanck TJ: Microanalysis of cardiolipin in small biopsies including skeletal muscle from patients with mitochondrial disease. *J. Lipid Res.* 40. 1585-1592 (1999)
- 49 Schweiger H, Lutjen-Drecoll E, Arnold E, Koch W, Nitsche R, Brand K: Ischemia-induced alterations of mitochondrial structure and function in brain, liver, and heart muscle of young and senescent rats. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 40(2). 162-185 (1988)

- 50 Shibata A, Ikawa K, Shimooka T, Terada H: Significant stabilization of the phosphatidylcholine bilayer structure by incorporation of small amounts of cardiolipin. *Biochim. Biophys. Acta* 1192. 71-78 (1994)
- 51 Statistisches Bundesamt Deutschland (DESTATIS), Wiesbaden, 2006  
[http://www.destatis.de/themen/d/thm\\_gesundheit.htm#Todesursachen](http://www.destatis.de/themen/d/thm_gesundheit.htm#Todesursachen)
- 52 Toleikis A, Dzeja P, Praskevicius A, Jasaitis A: Mitochondrial functions in ischemic myocardium. I. Proton electrochemical gradient, inner membrane permeability, calcium transport and oxidative phosphorylation in isolated mitochondria. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11(1). 57-76 (1979)
- 53 Turrens JF: Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* 17. 3-8 (1997)
- 54 Wallace DC: Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256. 628-632 (1992)

**Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Rolle von endogenem Cardiolipin bei der Schädigung von isolierten Herzmitochondrien durch Hypoxie, Reoxygenierung und Calciumionen“

im Institut für Klinische Chemie und Pathologische Biochemie

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 01.06.2006

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. C. Luley und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Gardemann danken, dass ich die für meine Dissertation erforderlichen Experimente an ihrem Institut durchführen durfte.

Herrn PD Dr. rer. nat. L. Schild danke ich für die Überlassung des Themas und für die Betreuung dieser Arbeit.

Zu Dank verpflichtet fühle ich mich auch gegenüber Frau Dr. rer. nat. I. Wiswedel. Sie stand mir bei der Lösung von auftretenden Problemen immer beratend zur Seite.

Frau Faber und Frau Widmayer möchte ich danken für eine gute Zusammenarbeit und ihre Mithilfe bei den Experimenten.

Ebenfalls danken möchte ich auch den anderen Mitarbeitern des Instituts, die in verschiedenster Weise den Fortgang dieser Arbeit gefördert haben.

Herrn Dr. W. Ebert danke ich für seine wertvollen Anregungen zur Struktur dieser Arbeit und meinen Eltern, deren Unterstützung ich mir stets sicher sein konnte.

## **Lebenslauf**

**Name:** Andreas Storch

**Geburt:** 30.01.1979 in Dresden

**Nationalität:** deutsch

**Familienstand:** verheiratet

### **Schul Ausbildung:**

1987 – 1992 60. Grund- und Mittelschule, Dresden

1992 – 1998 „Joseph-Haydn-Gymnasium“ Dresden-Striesen

03.07.1998 Abitur

### **Studium:**

01.10.1999 – 24.04.2006 Studium an der „Otto-von-Guericke-Universität“  
Magdeburg im Studiengang Humanmedizin

### **Studienbegleitende Tätigkeiten:**

04/2003 Kurs: „Grundlagen der Fachsprache“ - Medical English  
des Sprachenzentrums der Universität Magdeburg

04-07/2005 Praktikum der Chirurgie im Mayo General Hospital  
Castlebar, Irland

### **Beruf:**

seit 01.06.2006 Assistenzarzt am Universitätsklinikum Magdeburg in der  
Klinik für Psychiatrie

Magdeburg, den 01.06.2006